

Analytisches System und Verfahren zur Analyse nichtlinearer optischer Signale

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Detektion optischer Signale welche beispielsweise von Streu-, Rausch- und Hintergrundsignalen überlagert sind. Im Speziellen eignet sich dieses Verfahren zum Nachweis schwacher nichtlinearer optischer Signale, wie beispielsweise von Lumineszenz nach Zweiphotonen-Anregung, d.h. nach gleichzeitiger Absorption von zwei Photonen relativ niedriger Energie (relativ langer Wellenlänge) durch einen lumineszenzfähigen Chromophor, was zur Emission eines Photons höherer Energie (kürzer Wellenlänge) als derjenigen des Anregungslichts in Form von Lumineszenz führt. [W. Denk, J.H. Strickler und W.W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", Science 248 (1990) 73-76; Duveneck, G.L., et al., "Evanescent-field-induced two-photon fluorescence: excitation of macroscopic areas of planar waveguides", Applied Physics B, 73 (2001) 869-871.].

Nichtlineare optische Signale sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre Signalhöhen in nichtlinearer Weise von der anregenden Lichtintensität abhängen. Im Fall der Zweiphotonen-Lumineszenzanregung, welche die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen des eingestrahnten Anregungslichts voraussetzt, ist die Intensität der resultierenden Lumineszenz proportional zum Quadrat der Anregungsintensität, im Gegensatz beispielsweise zur konventionellen Einphotonen-Lumineszenzanregung, bei der die Intensität der nach Absorption jeweils eines einzelnen Anregungsphotons höherer Energie (kürzerer Wellenlänge) durch lumineszenzfähige Moleküle induzierte Emission niederenergetischer Lumineszenz (längerer Wellenlänge) im allgemeinen linear von der Anregungsintensität abhängt. Abweichungen von diesem linearen Zusammenhang für die durch Absorption jeweils eines einzelnen Photons durch einen lumineszenzfähigen Chromophor erzeugte Lumineszenz treten beispielsweise im Falle einer Inversion der Besetzungszahlen von höher- und niederenergetischen angeregten Zuständen (wie sie für das Funktionsprinzip eines Lasers typisch sind) oder bei der Annäherung an die Sättigung eines angeregten Zustands und an die entsprechende Entleerung des Grundzustands auf. Ein weiteres Beispiel für eine lineare Abhängigkeit von der Intensität des eingestrahnten Anregungslichts ist die

BEST AVAILABLE COPY

Intensität des Streulichts von rauen Oberflächen. Demgegenüber sind die Intensität von Hintergrundlicht und von Rauschen der gemessenen Lichtsignale bei vielen Messanordnungen unkorreliert zum Anregungslicht.

In der Praxis zeigt sich, dass die Nachweisgrenze für schwache Lichtsignale, beispielsweise von Emissionen eingesetzter Lumineszlabel zum analytischen Nachweis in einer Probe befindlicher Stoffe geringer Konzentration, oft bestimmt wird durch Streulicht des Anregungslichts (z. B. eines Lasers). Da das Lumineszenzlicht und das Anregungslicht unterschiedliche Wellenlängen haben, kann man diese bis zu einem gewissen Grad spektral trennen, beispielsweise mit Transmissionsfiltern (Bandpass-Filtern wie z. B. Interferenzfiltern oder Hochpass-Filtern). Insbesondere im Fall von durch Einphotonen-Absorption angeregter Lumineszenz erreicht jedoch oft ein nicht vernachlässigbarer Anteil von Streulicht den Detektor. Ursache ist u.a. die meist kleine spektrale Trennung von Anregung und Lumineszenz (Stokes-Shift) und der typischerweise große Intensitätsunterschied zwischen extrem schwachen (Lumineszenz-) Signalen und relativ starkem Streulicht des Anregungslichts.

Primäre Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, aus ein-, zwei- oder mehrdimensionalen Bildern mit der Intensität des Anregungslichts linear korrelierte und unkorrelierte Anteile zu entfernen. Dabei soll unter einem „ein-, zwei- oder mehrdimensionalen Bild“ die Aufzeichnung der gemessenen Lichtintensitäten als Funktion von ein, zwei oder mehr (dann typischerweise drei) Ortskoordinaten verstanden werden. Diese Aufzeichnung kann in Form einer Abbildung (z. B. einer Photographie, deren Intensitätswerte im Laufe der weiteren Schritte des erfindungsgemässen Verfahrens digitalisiert werden) oder einer numerischen Datei, beispielsweise in Form eines Computer-Files, vorliegen.

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist, dass die Trennung von unterschiedlichen Lichtanteilen nicht wellenlängenspezifisch erfolgt, sondern entsprechend deren nichtlinearem Charakter. Somit können auch lineare und nichtlineare Lichtanteile (d.h. linear und nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte Lichtanteile) bei gleicher Wellenlänge getrennt werden. Mit dem

nachfolgend beschriebenen Verfahren lässt sich diese Trennung auch in Echtzeit für ein-, zwei- oder mehrdimensionale Bilder durchführen.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend vor allem vor dem Hintergrund von Lumineszenzanregung und -detektion als Beispiel für ein weit verbreitetes Nachweisverfahren in der (bio-)chemischen Analytik und als ein wichtiges Anwendungsgebiet der Erfindung erläutert. Die Erfindung ist jedoch direkt anwendbar auf weitere optische Techniken, wie beispielsweise „Second Harmonic Generation“ (wobei die Einstrahlung eines Anregungslichts einer bestimmten Wellenlänge in der Ausstrahlung eines Antwortlichts der halben Wellenlänge, bezüglich der Wellenlänge des eingestrahnten Anregungslichts, führt) und deren Anwendungsgebiete sowie auf weitere Techniken ganz oder teilweise nicht-optischen Charakters, welche die Detektion von Signalen zum Gegenstand haben, welche der Intensität eines leistungsmodulierten stimulierenden Anregungssignal in nicht-linearer Weise folgen.

Technischer Hintergrund der Erfindung

Beispielsweise in der biochemischen Analytik besteht ein hoher Bedarf nach Anordnungen und Methoden, mit denen, unter Verwendung von auf einer Oberfläche immobilisierten biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselementen, ein oder mehrere in einer zugeführten Probe befindliche Analyten mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit nachgewiesen werden sollen. Viele bekannte Nachweismethoden stützen sich dabei auf die Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen in Anwesenheit des einen oder der mehreren Analyten.

Mit dem Begriff „Lumineszenz“ wird dabei in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff „Lumineszenz“ mit eingeschlossen.

Der Begriff „optische Transparenz eines Materials“ wird im folgenden in dem Sinne verwendet, dass die Transparenz dieses Materials bei mindestens

einer Anregungswellenlänge gefordert wird. Bei einer längeren oder kürzeren Wellenlänge kann dieses Material auch absorbierend sein.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit für einen Analytnachweis deutlich gesteigert werden. Dabei macht man sich zunutze, dass die Lichtleitung in dem hochbrechenden Material eines Wellenleiters mit der Ausbildung eines sogenannten evaneszenten Feldes verbunden ist, welches eine Eindringtiefe von molekularer Größenordnung, d.h. von einigen hundert Nanometern, in die benachbarten Medien mit niedrigerem Brechungsindex hat. Damit ist ein strikt oberflächengebundenes Anregungsfeld verfügbar, welches erlaubt, Vorgänge selektiv innerhalb einer durch die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die niederbrechenden Medien definierten Schichtdicke zu studieren. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film einer Sensorplattform eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop abgestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen wie zum Beispiel Photodioden, Photomultiplier oder CCD-Kameras gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Die Begriffe "evaneszentes Feld" und "Nahfeld" werden nachfolgend synonym verwendet.

Ein Nachteil der vorangehend im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und WO 95/33198, beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz liegt darin, dass mit den darin beschriebenen Ausführungsformen von Sensorplattformen jeweils nur eine Probe analysiert wird. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind

fortlaufend aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dieses gilt insbesondere, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dieses im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als Ganzes verwendet werden muss.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von lumineszenzbasierenden Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht bestrahlt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform relativ gross ist und daher wieder nur eine verhältnismässig geringe Dichte unterschiedlicher Messfelder (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Es bestand daher der Bedarf nach einer Vergrösserung der Feature-Dichte bzw. nach einer Verkleinerung der erforderlichen Fläche pro Messbereich.

Basierend auf einfachen Glas- oder Mikroskop-Plättchen, ohne zusätzliche wellenleitende Schichten, sind Arrays als sogenannte „Mikroarrays“ mit einer sehr hohen Feature-Dichte bekannt. Beispielsweise werden in der US 5445934 (Affymax Technologies) Arrays von Oligonukleotiden mit einer Dichte von mehr als 1000 Features pro Quadratzentimeter für den Nachweis von Nukleinsäuren mit komplementären (Teil-)Sequenzen beschrieben und beansprucht. Die Anregung und das Auslesen solcher Arrays beruht auf klassischen optischen Anordnungen und Methoden. Es kann das ganze Array gleichzeitig mit einem aufgeweiteten Anregungslichtbündel beleuchtet werden, was jedoch zu einer relativ geringen Empfindlichkeit führt, da die Anregung nicht auf die wechselwirkende Oberfläche beschränkt ist und da ausserdem der Streulichtanteil relativ gross ist und Streulicht oder Untergrundfluoreszenzlicht aus dem Glassubstrat auch in den Bereichen erzeugt wird, in denen sich keine zur Bindung des Analyten immobilisierten Oligonukleotide befinden. Um die Anregungsintensität zu erhöhen und die Empfindlichkeit bei der

Detektion zu verbessern, werden vielfach konfokale Messanordnungen eingesetzt und die verschiedenen Features sequentiell mittels "Scannen" ausgelesen. Dieses hat jedoch einen grösseren Zeitaufwand zum Auslesen eines grossen Arrays und einen relativ komplexen optischen Aufbau zur Folge.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das Format derartiger „Mikroarrays“ auf planare Dünnschichtwellenleiter als Träger (Sensorplattform) übertragen werden kann, ohne dass der Anteil der in den Wellenleiter zurückgekoppelten, im evaneszenten Feld angeregten Lumineszenz zu einem signifikanten Übersprechen von Signalen aus verschiedenen Messbereichen führt. Mit dieser Anordnung konnte eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit, um einen Faktor 50 bis 100, im Vergleich zu den herkömmlichen Messanordnungen erreicht werden [G.L. Duveneck et al., *Analytica Chimica Acta* 469 (2002) 49–61].

Für alle genannten Konfigurationen bleiben jedoch schliesslich vor allem die Untergrundsignale und das damit verbundene Rauschen des Untergrunds limitierend für die jeweils erreichbaren Nachweisgrenzen. Dieses ist für diese, ebenso wie für alle vorgenannten Anregungs- und Detektionskonfigurationen, unter anderem dadurch bedingt, dass bei den meisten verwendeten Lumineszenzfarbstoffen der spektrale Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (Stokes-Shift) relativ gering ist, typischerweise zwischen 20 nm und 50 nm. Zwar sind einige Lumineszenzfarbstoffe bekannt, welche einen grossen Stokes-Shift, bis etwa 300 nm, aufweisen, wie beispielsweise einige Lanthanid-Komplexe. Diese besitzen nachteilig jedoch im allgemeinen eine relativ niedrige Quantenausbeute und / oder geringe Photostabilität.

Ausserdem ist bei den bekannten Anordnungen basierend auf hochbrechenden Dünnschichtwellenleitern, beispielsweise basierend auf wellenleitenden Schichten aus Ta_2O_5 oder TiO_2 , mit herkömmlicher Anregung nachteilig, dass die Ausbreitungsverluste dieser Wellenleiter, wie auch die Eigenfluoreszenz dieser Dünnschichtwellenleiter (beispielsweise durch Spuren von fluoreszenten Verunreinigungen in der Trägerschicht (b)), bei kurzen Anregungswellenlängen drastisch ansteigen. So ist hier kurzwellige Anregung bei etwa 450 nm bis 500 nm limitiert. Es wäre jedoch eine Anordnung wünschenswert, mit der Fluorophore auch

bei kürzeren Wellenlängen angeregt werden und ihre Lumineszenzen mit einem möglichst niedrigen oder bestenfalls sogar ohne Untergrund detektiert werden können.

Seit einigen Jahren sind Methoden bekannt geworden, welche auf Multiphotonen-Anregung, insbesondere Zweiphotonen-Anregung beruhen. Eine Zweiphotonen-Anregung erfordert jedoch extrem hohe Feldstärken bzw. Intensitäten des Anregungslichts. Diese erreicht man in den beschriebenen Anordnungen mit leistungsstarken Pulslasern extrem kurzer Pulslängen (typischerweise von Femtosekunden). Bisherige Systeme benutzen optische Anordnungen, welche mit sehr hohen Systemkosten verbunden sind und hohe Anforderungen an die fachliche Qualifikation des Benutzers stellen. Sie sind daher für routinemässige Anwendungen, ausserhalb des Forschungsbereichs, nicht geeignet. Die erforderlichen Intensitätsdichten werden bisher beispielsweise mit gepulsten Hochleistungslasern in konfokalen mikroskopischen Anordnungen erreicht, wie es zum Beispiel in dem US-Patent Nr. 5034613 beschrieben ist, mit einem Laserfokusedurchmesser von weniger als einem Mikrometer in der Fokusebene des Mikroskops. Die Ausmessung einer ausgedehnten Fläche mittels Scannens erfordert jedoch wiederum neben dem grossen instrumentellen Aufwand nachteilig auch einen hohen Zeitaufwand.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass es mithilfe planarer Dünnschichtwellenleiter möglich ist, Zweiphotonen-Lumineszenzanregung nicht nur in einem mikroskopischen Anregungsstrahldurchmesser, sondern makroskopisch auf Flächen von etlichen Quadratmillimetern an der Oberfläche eines geeigneten Dünnschichtwellenleiters durchzuführen [Duveneck, G.L., et al., "Evanescent-field-induced two-photon fluorescence: excitation of macroscopic areas of planar waveguides", Applied Physics B, 73 (2001) 869-871; WO 01/79821; WO 02/79765]. Durch diese neuartige Kombination von Wellenleitertechnologie mit Zweiphotonen-Lumineszenzanregung wird es möglich, das langwellige Anregungslicht spektral deutlich vom kürzerwelligen Emissionslicht zu trennen. Allerdings wird dieser Vorteil der grösseren spektralen Trennung teilweise wieder dadurch aufgehoben, dass aufgrund der wesentlich kleineren Quantenausbeuten der Zweiphotonen-induzierten Lumineszenz, im Vergleich zur herkömmlichen Einphotonen-induzierten

Lumineszenz, das Verhältnis zwischen nur sehr schwacher Emissionsintensität und sehr starker Intensität des Anregungsstreulichts wesentlich ungünstiger als im Falle der Einphotonen-induzierten Lumineszenz ist.

Es besteht daher das Bedürfnis nach einem Verfahren und einer analytischen Messanordnung, womit auch für die Zweiphotonen-induzierte Lumineszenz, als Beispiel für optische Signale, welche der Intensität eines Anregungssignal in nichtlinearer Weise folgen, eine wirksame Trennung vom Anregungslicht (Anregungssignal) durchgeführt werden kann. Zugleich ist es wünschenswert, für ein solches Verfahren und eine solche Messanordnung die spezifische Eigenschaft der nichtlinearen Korrelation mit dem Anregungslicht vorteilhaft auszunutzen.

Spektrale Trennmethode haben den generellen Nachteil einer niemals vollständigen Unterdrückung des zu diskriminierenden Anregungslichts (Anregungssignals) und einer ebenfalls nicht vollständigen Transmission für die zu detektierende Emissionswellenlänge. Zusätzlich ist beispielsweise die Wirksamkeit von Interferenzfiltern nachteilig noch deutlich abhängig vom Auftreffwinkel des Lichts auf dem Filter.

Eine elegante Alternative zur spektralen Trennung von Anregungs- und Emissionssignal besteht in der sogenannten „Lock-in“-Technik, welche schon seit langem bekannt ist zur punktförmigen Signaldetektion (d.h. in Kombination mit null-dimensionalen Detektoren) [Meade, M. L., „Lock-in amplifiers: principles and applications“, London (1983), Peregrinus 232]. Das Grundprinzip dieser Technik beruht auf der Modulation des Anregungssignals mit einer wählbaren Modulationsfrequenz und der mit dieser Modulationsfrequenz korrelierten Detektion des Emissionssignals. Beispielsweise kann die Modulation der auf ein Wechselwirkungsvolumen oder auf eine Wechselwirkungsschicht auftreffenden Anregungslichtintensität mithilfe einer rotierenden Scheibe mit einer Anordnung von Schlitz und geschlossenen Bereichen (einem sogenannten „Chopper“) erfolgen, womit der Anregungslichtweg alternierend blockiert und freigegeben wird. Alternativ kann beispielsweise auch der Anregungsstrom einer Laserdiode moduliert werden. Das resultierende Emissionslicht bei den periodisch variierenden Beleuchtungsbedingungen (in Abwesenheit und in Anwesenheit von Anregungslicht) wird auf einen Detektor geleitet, dessen Ansprechzeit mindestens der Modulationsfrequenz entspricht. Ein zugehöriger sogenannter

Lock-in Verstärker verstärkt nur jene Signale, die mit der Modulationsfrequenz korreliert sind, indem die Differenz der ihm zugeleiteten Detektorsignale bei den verschiedenen Phasen gebildet wird. Damit werden die vom Detektor gemessenen Lichtanteile, welche nicht mit der modulierten Anregungsintensität korreliert sind, eliminiert. Die Lock-in-Technik erlaubt es unter geeigneten Bedingungen auch, durch Messung der Phasendifferenz zwischen maximaler Anregungslichtintensität und maximaler Emissionslichtintensität die Abklingzeit, d.h. die Lebensdauer dieser Emission nach pulsförmiger Anregung, zu bestimmen.

Bei der vorangehend beschriebenen traditionellen Lock-in Technik werden typischerweise die zum Anregungslicht proportionalen Signalanteile mit einem einzelnen Detektor („Punktdetektor“) für die Weiterverarbeitung selektiert und nicht mit dem Anregungssignal korrelierte Antwortsignalanteile verworfen.

Es sind verschiedene Arbeiten zur Übertragung der beschriebenen Lock-in Technik oder damit verwandter Methoden auf ein oder zweidimensionale Detektor-Arrays bekannt. In der WO 96/15625 werden eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion eines intensitätsmodulierten Strahlungsfeldes beschrieben, wobei der Demodulationsprozess elektronisch in einem Detektor-Array integriert ist. Diese Methode ist beispielsweise für Laufzeitmessungen („time of flight“, TOF) oder heterodyne Interferenzmessungen von entfernten, bewegten Objekten geeignet. Die Methode beruht auf der Filterung von linearen Signalanteilen vom Hintergrundlicht. Aus der gemessenen Laufzeit oder Phasenverschiebung in einem interferometrischen Verfahren wird beispielsweise die Entfernung zu einem Objekt bestimmt. In der Beschreibung wird erwähnt, dass, im Falle eines sinusförmig modulierten Strahlungsfeldes, bei einer Anzahl von vier Abtastungen (Signalmessungen) je Periode die Amplitude, die Phase und das Hintergrundlicht des Strahlungsfeldes bestimmt werden können, und dass bei einer Erhöhung der Abtastrate weitere Parameter des Strahlungsfeldes, wie beispielsweise Fourierkoeffizienten, bestimmt werden können. Es werden jedoch keinerlei Angaben gemacht, wie eine solche Weiterentwicklung realisiert werden könnte, sondern es wird ausschliesslich die Detektion linearer Signalanteile des Strahlungsfeldes beschrieben. In einer Publikation [T. Spirig, P. Seitz, O. Vietze und F. Heitger, „The Lock-In CCD – Two-Dimensional Synchronous Detection of Light“, IEEE Journal of Quantum Electronics

31 (1995) 1705 – 1708] der zugrundeliegenden Arbeiten wird die technische Umsetzung des Detektors, dort bezeichnet als „Lock-in CCD“ (CCD: „charge-coupled device“) näher beschrieben. Weiterentwicklungen dieser Anordnung werden beschrieben in T. Spierig, M. Marley und P. Seitz, „The Multitap Lock-In CCD with Offset Subtraction“, IEEE Transactions on Electronic Devices 44 (1997) 1643 – 1647 und in der internationalen Patentanmeldung WO 01/84182. Jedoch enthalten beide Arbeiten keinerlei Hinweise auf Möglichkeiten zur Detektion nichtlinear mit der Intensität eines am Messort verfügbaren Anregungsfeldes korrelierter Signalanteile.

Demgegenüber hat die vorliegende Erfindung die Trennung der nichtlinearen Signalanteile von den übrigen Anteilen, welche linear korreliert oder unkorreliert zu einem modulierten Anregungsfeld sind, zum Gegenstand. Der vorliegenden Erfindung folgend, sollen also gerade solche Signalanteile verworfen werden, deren Detektion die Aufgabe der in der WO 96/15626 und den weiteren vorgenannten Publikationen beschriebenen Erfindung ist. Ausserdem haben die erfindungsgemässe Anordnung und das damit auszuführende erfindungsgemässe Verfahren den Vorteil, dass sie die Verwendung jedes beliebigen ein- oder zweidimensionalen Detektor-Arrays ermöglichen, sofern dessen elektronische Ansprechzeit kurz genug ist, um der Frequenz der Modulation der Anregungslichtleistung und damit der Modulation der Intensität des vom Messort ausgehenden, nachzuweisenden Lichts zu folgen. Die Verwendung von Detektoren wie den beschriebenen „Lock-in CCDs“ ist für die erfindungsgemässe Anordnung und das erfindungsgemässe Messverfahren möglich, aber keineswegs notwendig.

Vor kurzem wurden Anwendung von zweidimensional ortsauflöser phasensensitiver Detektion in der Interferenz-Mikroskopie bekannt [A. Dubois, “Phase-map measurements by interferometry with sinusoidal phase modulation and four integrating buckets”, J. Opt Soc. Am. A 18 (2001) 1972 – 1979; A. Dubois, L. Vabre, A.C. Boccara und E. Beaurepaire, “High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope”, Applied Optics 41 (2002) 805 – 812]. In den beschriebenen Anordnungen wird jeweils eine kommerzielle CCD-Kamera als Detektor verwendet. Die Kamerabilder werden, wie im einem Ausführungsbeispiel unserer Erfindung, als Daten auf einen Computer übertragen, und die phasensensitive Demodulation dieser Daten wird durch numerische Analyse

mithilfe des Computers durchgeführt. Das in den beiden genannten Publikationen beschriebene Verfahren ist beschränkt auf die Trennung von konstantem Hintergrundlicht und linearen Interferenzsignalen, welche durch Beleuchtung mit einer Lichtquelle erzeugt werden. In den beschriebenen Anordnungen werden zwei Lichtstrahlen konstanter Intensität, aber modulierter Phasenverschiebung zur Interferenz gebracht. Als Anwendung dieses Verfahrens wird die Messung von zweidimensionalen Höhenprofilen, z.B. von Oberflächen mit einer Strukturierung in der Größenordnung von Mikrometern oder Nanometern, beschrieben. In den beiden Publikationen wird die mathematische Methode der Fourierreihen-Entwicklung eines Zeitsignales verwendet; es wird explizit nur die Phasenlage des ersten, harmonischen Koeffizienten, der ein Mass für den Abstand des Probenpunktes (Messortes) vom Detektor ist, benutzt.

Die vorliegende Erfindung betrifft demgegenüber nicht die Messung von Höhenprofilen, Abstandsmessungen, oder Objekterkennung bei modulierter Beleuchtung. Unter den Bedingungen der Anwendung unserer Erfindung ist die Position des Messortes sehr genau bekannt. Auch erfordert die vorliegende Erfindung keine Erzeugung von Interferenzmustern, ist aber geeignet, auch diese zu analysieren, sofern sie nichtlineare Signalanteile haben. Im Gegensatz zu der in den beiden Publikationen beschriebenen Bestimmung linear mit einem Anregungslicht korrelierter Signalanteile von einem durch diese Analyse zu ermittelnden, vorher unbekannten Messort ist die vorliegende Erfindung vorgesehen für die in ein oder mehr Ortskoordinaten orts aufgelöste Erzeugung von Abbildungen nichtlinear mit einem Anregungslicht korrelierter Signale, die von einem wohlbekannten Messort ausgehen. Eine mögliche Ausführungsform der Erfindung basiert auf phasensensitiver Detektion bei der zweiten Harmonischen der Anregungsmodulation. Die Phasenlage des nichtlinearen Signals liefert in diesen Fall keine Information über die räumliche Position, sondern beispielsweise über den chemischen Charakter. Man kann damit z.B. Anregungslebensdauern messen, im Gegensatz zu Laufzeitunterschieden bei den oben zitierten Publikationen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Es wurde nun überraschend gefunden, dass es mit einem erfindungsgemässen analytischen System und einem damit ausgeführten Analyseverfahren möglich ist, nichtlinear mit einem modulierten Anregungssignal korrelierte optische Signale ohne zusätzliche Filterung, wie beispielsweise spektrale Filterung, zweifelsfrei zu detektieren, obwohl sie in dem ursprünglich aufgenommenen Signal vor dem damit verbundenen Signalrauschen in keiner Weise erkennbar sind. Dieses wird erfindungsgemäss dadurch ermöglicht, dass nicht nur ausschliesslich die nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierten Signalanteile selektiert und übrige Signalanteile verworfen werden, sondern zugleich das Rauschen des selektierten nichtlinearen Signals im Vergleich zum Rauschen des ursprünglichen Signals signifikant vermindert wird.

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur hochempfindlichen gleichzeitigen Messung nichtlinearer optischer Emissionssignale, orts aufgelöst in einer oder zwei Ortsdimensionen, umfassend:

- Einstrahlung des Anregungslichts von mindestens einer Lichtquelle in einer leistungsmodulierten und / oder pulsdauermodulierten Form in ein Wechselwirkungsvolumen oder zu einer Wechselwirkungsfläche oder einer Wechselwirkungsschicht (zusammengefasst unter der Bezeichnung "Wechselwirkungsräume"), in welchen Wechselwirkungsräumen jeweils eine oder mehrere nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte Emissionen angeregt werden können,
- Messung des von besagten Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts mit einem ein- oder zweidimensionalen Detektor-Array,
- Übertragung der Messdaten von besagtem Detektor-Array auf einen Computer und Formatierung der Daten in einer ein- oder mehrdimensionalen Datenmatrix, dadurch gekennzeichnet, dass die zur Intensität des in den Wechselwirkungsräumen verfügbaren Anregungslichts linear proportionalen Anteile des von dort ausgehenden Lichts von zur verfügbaren Anregungslichtintensität nichtlinear proportionalen Anteilen des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts getrennt werden.

Dabei soll unter einem „Wechselwirkungsvolumen“ ein dreidimensionales Volumen verstanden werden, auf welches das Anregungslicht einwirkt und in welchem unter

geeigneten Bedingungen nichtlinear mit der Intensität eines moduliert eingestrahnten Anregungslicht korrelierte Antwortsignale erzeugt werden können. Beispielsweise kann es sich bei besagten nichtlinear korrelierten Antwortsignalen um eine Lumineszenz nach Multiphotonen-Anregung oder um "Second Harmonic"-Signal, d.h. um ein Antwortsignal bei der Hälfte der eingestrahnten Anregungswellenlänge (frequenzverdoppeltes Signal) handeln. Derartige Signale können beispielsweise von geeigneten Chromophoren ausgehen. Multiphotonen-induzierte Emissionen können bei einer Vielzahl von Chromophoren erzeugt werden, sofern ausreichend hohe Anregungsintensitäten bereitgestellt werden. Zur Anregung von Lumineszenz (genauer Fluoreszenz) nach Zweiphotonen-Absorption sind Rhodamine als besonders gut geeignet bekannt. Für „Second Harmonic Generation“ sind Moleküle mit einer asymmetrischen Anordnung ihrer molekularen Gruppen als besonders geeignet bekannt.

Entsprechend soll unter einer „Wechselwirkungsfläche“ die Oberfläche zwischen einem festen Träger und einem benachbarten Medium oder die Grenzfläche zwischen unterschiedlichen physikalisch-chemischen Phasen (was z.B. auch nicht mischbare unterschiedliche Flüssigkeiten sein können) verstanden werden, an denen bzw. auf denen nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte Antwortsignale erzeugt werden können.

Als „Wechselwirkungsschicht“ soll eine Schicht oberhalb oder unterhalb einer derartigen Wechselwirkungsfläche handeln, in der die beschriebenen nichtlinearen Antwortsignale erzeugt werden können. Beispielsweise kann es sich bei einer solchen „Wechselwirkungsschicht“ um das Volumen eines Mediums über einem optischen Wellenleiter handeln, wobei die Schichtdicke durch die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes des im Wellenleiter bzw. in der wellenleitenden Schicht oder dem wellenleitenden Film geführten Lichts in besagtes Medium definiert wird.

Die so definierten Begriffe „Wechselwirkungsvolumen“, „Wechselwirkungsfläche“ und „Wechselwirkungsschicht“ sollen unter der Bezeichnung „Wechselwirkungsraum“ zusammengefasst werden.

Als „nichtlinear mit einem Anregungslicht bzw. dessen Intensität korrelierte Antwortsignale“ sollen solche Signale bezeichnet werden, die eine streng monotone Änderung mit der Grösse (Intensität) des Anregungssignals zeigen, welche aber nicht von linear proportionaler Natur ist. Signale, die sich bei einer Änderung des Anregungslichts bzw. von dessen Intensität in einer nicht systematischen Weise oder in rein statistischer Art ändern, sollen als mit dem Anregungslicht bzw. mit dessen Intensität „unkorreliert“ bezeichnet werden.

„Leistungsmodulierte Form“ und „pulsdauermodulierte Form“ sollen zusammenfassend bezeichnet werden als „modulierte Form“ des Anregungslichts.

Die Modulation des Anregungslichts kann auf verschiedene Weise erfolgen. Beispielsweise kann dieses mithilfe eines akusto-optischen Modulators (AOM), eines Flüssigkristall- (LCD) Abschwächers, einer rotierenden Wellenplatte in Kombination mit einem Polarisator oder eines variablen Neutralfilterfilters erfolgen.

Die Trennung der unterschiedlichen mit der Anregungslichtintensität korrelierten Signalanteile erfolgt aus der Verarbeitung der bei unterschiedlicher Anregungsleistung aufgenommenen, in ein oder zwei Ortsdimensionen ortsaufgelösten Antwortsignale. Dabei kann es sich beispielsweise um mit einer CCD-Kamera aufgenommene Bilder handeln, welche in digitaler Form auf einen Computer übertragen und entsprechend in einer ein- oder mehrdimensionalen Datenmatrix abgespeichert werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass sie keine spektrale Filterung des zu detektierenden, von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts umfasst. Das erfindungsgemässe Verfahren kann jedoch auch in Kombination mit einer solchen spektralen Filterung durchgeführt werden. In diesem Falle wird der Einsatz solcher spektral selektiver optischer Komponenten bevorzugt, welche eine vorhandene Ortsauflösung der Signale (wie beispielsweise zweidimensionale Messungen von Lichtintensitäten) erhalten. Geeignet sind beispielsweise Kanten- (z. B. Hochpass- oder Tiefpass-Filter) und Bandpass-Filter (wie z. B. Interferenzfilter, Nodge-Filter etc.).

Besagtes ein- oder zweidimensionales Detektor-Array kann ausgewählt sein aus der Gruppe, welche CCD-Kameras, CCD-Chips, CMOS-Kameras, CMOS-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannel-Plates und Vielkanal-Photomultiplier umfasst, wobei eine phasensensitive Demodulation in besagtes Detektor-Array integriert sein kann. Die Zeitauflösung der Detektion sollte so hoch sein, dass sie mindestens der doppelten Frequenz der Modulation des Anregungslichts folgen kann. Dabei erweist es sich als ein weiterer wichtiger Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass auch Detektoren mit einem relativ starken Rauschen, welche relativ preiswert sind, aber bisher für hochempfindliche Messungen aufgrund des hohen Rauschens nicht einsetzbar wären, verwendet werden können, da die mit dem Anregungslicht unkorrelierten Rauschkomponenten erfindungsgemäss eliminiert werden.

Eine Vielzahl möglicher Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts mittels opto-mechanischer und / oder akusto-optischer und / oder elektro-optisch aktiver Hilfsmittel erfolgt.

Besagte opto-mechanische und / oder akusto-optische und / oder elektro-optisch aktiven Hilfsmittel können ausgewählt sein aus der Gruppe, welche mechanische Shutter (vergleichbar mit Kamera-Verschlüssen) und rotierende Chopper, welche jeweils alternierend den Lichtweg zwischen der Anregungslichtquelle und dem Wechselwirkungsraum blockieren und freigeben, polarisationsselektive Komponenten wie beispielsweise rotierende Halbwellen-Platten in Kombination mit Polarisatoren, Flüssigkristall-Abschwächer, elektro-optisch aktive Kristalle, in ihrer Transmission örtlich oder zeitlich variable Neutraldichte-Filter, akusto-optische Modulatoren sowie Modulatoren, die auf Interferenzeffekten beruhen, wie beispielsweise Michelson-Interferometer oder Mach-Zehnder-Interferometer, umfasst.

Charakteristisch für andere Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens ist, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts mittels direkter, aktiver Modulation des von der Anregungslichtquelle ausgestrahlten Lichts erfolgt. Beispielsweise ist es möglich, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten

Anregungslichts mittels Modulation des Anregungsstromes für einen Halbleiterlaser als Anregungslichtquelle erfolgt.

Zahlreiche mögliche Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens zeichnen sich dadurch aus, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts periodisch erfolgt. Es ist aber auch möglich, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts nicht-periodisch erfolgt.

Die möglichen Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens zeichnen sich mehrheitlich dadurch aus, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts in der Modulation der eingestrahlten Intensität besteht.

Eine spezielle Variante besteht darin, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts in der gleichzeitigen Modulation der Pulsdauer und der Spitzenleistung des eingestrahlten Anregungslichts besteht, wobei vorzugsweise die Spitzenleistung invers proportional zur Pulsdauer variiert wird und besonders bevorzugt das Integral der Pulsleistung konstant bleibt.

Es ist möglich, das erfindungsgemässe Verfahren ohne Detektion des modulierten Anregungslichts oder einer dazu proportionalen Messgrösse durchzuführen. Bevorzugt werden jedoch solche Ausführungsformen des Verfahrens, welche neben der Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts die Detektion des modulierten Anregungslichts oder einer dazu proportionalen Messgrösse umfassen.

Im Rahmen des erfindungsgemässen Verfahrens erfolgt typischerweise die Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts zeitlich korreliert mit der Modulation der Anregungslichtleistung. Dabei ist es möglich, dass die Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts mit einer Frequenz erfolgt, die einem ganzzahligen Vielfachen der Modulationsfrequenz der Anregungslichtleistung entspricht.

Zur Durchführung der Trennung der unterschiedlich mit der Anregungslichtintensität korrelierten Antwortsignalanteile sind gemäss des vorliegenden erfindungsgemässen Verfahrens verschiedene Ausführungsformen möglich.

Mehrere mögliche Ausführungsformen zeichnen sich dadurch aus, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer parallelen Reihenentwicklung erfolgt. Es wird bevorzugt, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer parallelen Taylor-Entwicklung erfolgt. Die Vorgehensweise ist im Detail in Beispiel 3.1, im Abschnitt zu den Ausführungsbeispielen der Erfindung, beschrieben.

Andere bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens zeichnen sich dadurch aus, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer harmonischen Analyse erfolgt. Die harmonische Analyse beruht darauf, dass nichtlineare Systeme bei harmonischer Anregung (Modulation bei konstanter Frequenz) Oberwellen erzeugen. Die Parameter dieser Oberwellen können durch Fourier-Analyse bestimmt werden. Linear mit dem Anregungslicht korrelierte Signale, beispielsweise von Streulicht, tragen nicht zu höheren Harmonischen bei. Weitere Erläuterungen hierzu werden in Beispiel 3.2 gegeben. Mithilfe dieser Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens lassen sich beispielsweise bei Detektion der zweiten Harmonischen streulichtfreie Bilder von durch Zweiphotonen-Absorption induzierten Lumineszenzsignalen anfertigen.

Charakteristisch für eine weitere bevorzugte Gruppe von Ausführungsformen ist, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mittels einer stufenförmigen Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt.

Besonders bevorzugt wird, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem

Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen unter Verwendung eines 4-Stufen-Algorithmus zur Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt. Diese Variante zeichnet sich dadurch aus, dass sie besonders einfach in die Praxis umsetzbar ist. In dieser Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wird die Leistung des Anregungslichts nicht kontinuierlich bei einer Frequenz moduliert, sondern periodisch in Stufen auf 4 diskrete Werte gesetzt. Dieses führt vorteilhaft dazu, dass der Aufwand zur Durchführung der notwendigen Berechnungen im Vergleich zu anderen Varianten deutlich reduziert werden kann. Diese Ausführungsform ist detailliert in Beispiel 3.3 beschrieben.

Für die vorgenannten Ausführungsformen mit einer stufenförmigen Modulation der Anregungslichtleistung werden die Stufenhöhen vorteilhaft so gewählt, dass die im mathematischen Analyseschritt des erfindungsgemässen Verfahrens zu eliminierenden linear mit dem Anregungslicht korrelierten Anteile oder mit dem Anregungslicht unkorrelierten Anteile in rechnerisch einfacher Weise zu jeweils Null summiert werden können. In der experimentellen Praxis können die Anregungslichtleistungen jedoch oft nicht exakt auf die dafür erforderlichen Sollwerte eingestellt werden, beispielsweise weil die Messung der im Wechselwirkungsraum eintreffenden Anregungslichtleistung schwer durchführbar ist.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform zeichnet sich daher dadurch aus, dass experimentell bedingte Abweichungen der Anregungslichtleistungen von den für die Modulation vorgesehenen Sollwerten mittels numerischer Korrekturen kompensiert werden. Insbesondere ist es vorteilhaft, falls erforderlich, wenn die unter Anwendung eines 4-Stufen Algorithmus zur Modulation gemessenen Antwortsignale mit Korrekturfaktoren multipliziert werden. Die Vorgehensweise zur Bestimmung von Korrekturfaktoren ist in Beispiel 3.3.1 beschrieben.

Vorteilhaft ist, wenn es möglich ist, die Korrekturfaktoren für die Antwortsignale aus gemessenen Anregungslichtleistungen für die Erzeugung besagter Antwortsignale zu bestimmen. Oft ist eine solche Messung jedoch zumindest mit der erforderlichen Genauigkeit nicht durchführbar. Dann wird bevorzugt, dass die Korrekturfaktoren für die Antwortsignale durch eine numerische Analyse der erzeugten Antwortsignalen bestimmt werden, wobei dieses beispielsweise durch Auswertung der Signale aus

hierfür ausgewiesenen Teilbereichen eines Wechselwirkungsraumes oder mithilfe separater Messungen (beispielsweise unter Verwendung einer Kalibrationsprobe) erfolgen kann.

Die mit dem erfindungsgemässen Verfahren verbundenen Berechnungen können mit handelsüblichen Computern in sehr kurzer Zeit durchgeführt werden. Daher zeichnet sich das erfindungsgemässe Verfahren dadurch aus, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen in Echtzeit zeitgleich (innerhalb der Aufzeichnungszeit für die Signalaufnahme) mit der Aufnahme der Signale aus dem Wechselwirkungsraum erfolgen kann.

Es wird bevorzugt, dass es sich bei dem Wechselwirkungsraum um eine Wechselwirkungsschicht an einer Oberfläche eines festen Trägers handelt, wobei die flächige Ausdehnung des Wechselwirkungsraumes (auf besagter Oberfläche dieses Trägers) durch die Wechselwirkungsfläche mit dem auftreffenden leistungsmodulierten Anregungslicht und seine Tiefe (Ausdehnung senkrecht zu besagter Oberfläche des Trägers) durch die Reichweite der modulierten Anregungslichtintensität in dieser Raumdimension senkrecht zu besagter Oberfläche des Trägers definiert sind. Typischerweise sind die Bedingungen so gewählt, dass die Anregungslichtintensität an dieser Oberfläche einen Maximalwert bestimmter Grösse hat und mit Abstand von dem festen Träger und dieser Oberfläche abnimmt. Als Reichweite der Anregungslichtintensität kann dann beispielsweise ein Abstand von dieser Oberfläche bezeichnet werden, bei dem die Anregungslichtintensität auf $1/e$ multipliziert mit der Intensität an dieser Oberfläche abgenommen hat.

Es wird ausserdem bevorzugt, dass sich innerhalb des Wechselwirkungsraumes Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen befinden, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft in der biochemischen Analytik eingesetzt werden. Eine Vielzahl biochemischer analytischer Methoden beruht darauf, dass der Nachweis eines oder mehrerer Analyten auf deren spezifischen Bindung mit immobilisierten spezifischen Bindungspartnern beruht.

Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens sind daher dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers einer oder mehrere spezifische Bindungspartner zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Bindungsassay (unter Bindung des Bindungspartners aus einer zugeführten Lösung an den immobilisierten Bindungspartner) immobilisiert sind, wobei der Analytnachweis anhand eines nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten optischen Antwortsignals des immobilisierten Bindungspartners selbst oder des in Lösung zugeführten Bindungspartners oder eines oder mehrerer weiterer, in einem oder mehreren zusätzlichen Verfahrensschritten zugeführter Bindungspartner, erfolgt.

Eine mögliche Variante ist dabei dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche des besagten festen Trägers immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um den einen oder die mehreren Analyten selbst handelt, welche eingebettet in eine native Probenmatrix oder in einer mit einem oder mehreren Aufbereitungsschritten modifizierten Form der Probenmatrix immobilisiert sind.

Die native oder in einem oder mehreren Aufbereitungsschritten modifizierte Probenmatrix kann beispielsweise ausgewählt sein aus der Gruppe von Extrakten gesunder oder krankhafter Zellen, (z. B. von menschlichen, tierischen, bakteriellen oder pflanzlichen Zellextrakten), Extrakten von tierischem oder menschlichem Gewebe, wie beispielsweise Organ-, Haut-, Haar- oder Knochengewebe, oder von Pflanzengewebe, sowie von Körperflüssigkeiten oder deren Bestandteilen, wie beispielsweise Blut, Serum oder Plasma, Gelenkflüssigkeiten, Tränenflüssigkeit, Urin, Speichel, Gewebeflüssigkeit, Lymphe. Insbesondere kann es sich auch um Extrakte stimulierter oder unbehandelter Zellen und Extrakte gesunden oder krankhaften Gewebes handeln. Die Probe kann beispielsweise einem Organismus oder Gewebe- oder Zellverband oder Zelle mittels einer Methode aus der Gruppe von Gewebeschnitten, Biopsie und „Laser Capture Micro Dissection“ entnommen sein.

Eine andere Variante des erfindungsgemässen Verfahrens unter Verwendung immobilisierter spezifischer Bindungspartner besteht darin, dass es sich bei den auf der Oberfläche des besagten festen Trägers immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung eines oder mehreren in einer zugeführten Probe befindlicher Analyten handelt.

Besagte Bindungspartner, d.h. die selbst immobilisierten nachzuweisenden oder in einer zugeführten Probe nachzuweisenden Analyten und / oder deren immobilisierte oder in einem zugeführten Nachweisreagens zugeführte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente können beispielsweise ausgewählt sein aus der Gruppe, welche Proteine, beispielsweise mono- oder polyklonale Antikörper und Antikörperfragmente, Peptide, Enzyme, Glycopeptide, Oligosaccharide, Lektine, Antigene für Antikörper, mit zusätzlichen Bindungsstellen funktionalisierte Proteine („Tag-Proteinen“, wie beispielsweise „Histidin-Tag-Proteinen“) sowie Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotide) und Nukleinsäureanaloge (z. B. PNA), Aptamere, membrangebundene und isolierte Rezeptoren und deren Liganden, durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürliche und künstliche Polymere, etc. umfasst.

Es wird bevorzugt, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers aufgebrachte Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder aufgebrachte spezifische Bindungspartner in diskreten Messbereichen (Spots) immobilisiert sind, welche eine beliebige Geometrie, beispielsweise kreisförmige, ovale, dreieckige, rechteckige, polygonartige Form etc. haben können, wobei ein einzelner Messbereich gleichartige oder unterschiedliche Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen oder spezifische Bindungspartner enthalten kann.

Besagte diskrete Messbereiche können beispielsweise durch räumlich selektive Aufbringung von Verbindungen oder Stoffen oder molekularen Teilgruppen, welche

unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder durch Aufbringung von spezifischen Bindungspartnern auf besagtem festen Träger erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, welche "Ink jet spotting", mechanisches Spotting, „micro contact printing“, fluidische Kontaktierung der Bereiche für die zu erschaffenden Messbereiche mit den zu immobilisierenden Verbindungen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen, sowie photochemische und photolithographische Immobilisierungsverfahren umfasst.

In vielen Fällen wird die Nachweisgrenze eines analytischen Verfahrens begrenzt durch Signale aufgrund sogenannter unspezifischer Bindung, d.h. durch Signale, welche durch Bindung von Analyten oder anderen, zum Nachweis besagter Analyten eingesetzten Verbindungen erzeugt werden, welche nicht nur im Bereich der immobilisierten spezifischen Bindungspartner, sondern auch in davon unbedeckten Bereichen an der Oberfläche des festen Trägers gebunden werden, beispielsweise durch hydrophobe Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkungen. Daher ist es von Vorteil, wenn zwischen den räumlich getrennten Messbereichen oder in unbesetzten Teilbereichen innerhalb dieser Messbereiche gegenüber den Analyten und / oder gegenüber seinen Bindungspartnern "chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, welche Albumine, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifische, polyklonale oder monoklonale, artfremde oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten und deren Bindungspartner unspezifische Antikörper (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 -, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierende, fragmentierte natürliche oder synthetische DNA, wie beispielsweise Extrakte von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladene, aber hydrophile Polymere, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, umfassen.

Es sind eine Vielzahl von Methoden für die Immobilisierung von Molekülen oder Molekülgruppen oder -komplexen auf einem festen Träger bekannt. Eine Möglichkeit besteht darin, dass an der Oberfläche besagten festen Trägers aufgebrachte Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder aufgebrachte spezifische Bindungspartner direkt oder mittels eines sogenannten Spacers ("Abstandshalters", ausgebildet als eigenständiges Molekül oder molekulare Gruppe) an der Oberfläche besagten festen Trägers immobilisiert sind unter Ausnutzung einer oder mehrerer Arten von Wechselwirkungen aus der Gruppe von Wechselwirkungen, welche hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen und kovalente Bindung umfasst.

Im allgemeinen ist es jedoch von Vorteil, wenn zwischen der Oberfläche besagten festen Trägers und den immobilisierten Verbindungen oder Stoffen oder molekularen Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder den aufgebrachten spezifischen Bindungspartnern eine Haftvermittlungsschicht aufgebracht ist, welche vorzugsweise eine Dicke von weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm hat, und welche vorzugsweise eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, welche Silane, funktionalisierte Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Mehrfachschichten", Thiole, Alkylphosphate und -phosphonate, multifunktionelle Block-Copolymere, wie beispielsweise Poly(L)ysin/Polyethylenglycole, umfassen.

Auf der Oberfläche des festen Trägers können eine Vielzahl von diskreten Messbereichen mit darin enthaltenen gleichartigen oder unterschiedlichen spezifischen Bindungspartnern angeordnet sein. Dabei können in einer 2-

dimensionalen Anordnung mehr als 10, bevorzugt mehr als 100, besonders bevorzugt mehr als 1000 Messbereiche auf einem Quadratzentimeter angeordnet sein.

Es wird bevorzugt, dass besagter fester Träger bei der Wellenlänge des einwirkenden Anregungslichts optisch transparent ist. Ausserdem ist es von Vorteil, wenn besagter fester Träger im wesentlichen planar ist.

Des weiteren wird bevorzugt, dass besagter fester Träger eine optische Wellenleiterstruktur, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfasst.

Besonders bevorzugt wird daher, wenn besagter fester Träger einen durchgehenden oder in diskrete wellenleitende Bereiche aufgeteilten planaren optischen Wellenleiter, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfasst.

Ganz besonders bevorzugt wird, dass besagter fester Träger einen planaren optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer im wesentlichen optisch transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer zweiten, ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und gegebenenfalls einer ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Zwischenschicht (b') zwischen Schicht (a) und Schicht (b) mit ebenfalls niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfasst.

Für die Einkopplung von Anregungslicht in einen optischen Wellenleiter gibt es eine Reihe unterschiedlicher technischer Lösungen. Es wird bevorzugt, dass eine wellenleitende Schicht besagten festen Trägers mit einem oder mehreren optischen Koppelementen in optischem Kontakt steht, welche die Einkopplung von Anregungslicht in die besagte wellenleitende Schicht ermöglichen, wobei besagte optische Koppelemente ausgewählt sind aus der Gruppe von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der besagten wellenleitenden Schicht der Evaneszentfeld-Sensorplattform angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern.

Besonders bevorzugt wird, dass in einer wellenleitenden Schicht des festen Trägers eine oder mehrere Gitterstrukturen (c) ausgeprägt sind, welche die Einkopplung von Anregungslicht ermöglichen.

Ausserdem ist es vorteilhaft, wenn in einer wellenleitenden Schicht des festen Trägers eine oder mehrere Gitterstrukturen (c') mit gleicher oder unterschiedlicher Gitterperiode und Gittertiefe wie Gitterstrukturen (c) ausgeprägt sind, welche die Auskopplung von in besagter wellenleitender Schicht geführtem Licht ermöglichen.

Verschiedene Ausführungsformen von optischen Wellenleiterstrukturen, insbesondere basierend auf Dünnschichtwellenleitern, sowie von optischen Systemen, welche für das erfindungsgemässe Verfahren ebenso wie als Bestandteil eines nachfolgend beschriebenen erfindungsgemässen analytischen Systems geeignet sind, sind beispielsweise in den internationalen Patentanmeldungen WO 95/33197, WO 95/33198, WO 96/35940, WO 98/22799, WO 99/58963, WO 01/13096, WO 01/43875, WO 01/55691, WO 01/79821, WO 01/92870, WO 02/20873, WO 02/21110, WO 02/40998, WO 02/46756, WO 02/46766 und WO 02/79765 beschrieben worden. Der Inhalt dieser Anmeldungen wird hiermit vollumfänglich als Bestandteil der vorliegenden Erfindung eingeführt.

Die mit dem erfindungsgemässen Verfahren nachzuweisenden nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierten Signale können unterschiedlicher Natur sein. Beispielsweise besteht eine Möglichkeit darin, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale die Signale einer Frequenzverdopplung („second harmonic generation“), Summen- oder Differenzfrequenzerzeugung umfassen.

Bevorzugt wird, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale durch eine Multiphotonen-Absorption induziert werden.

Besonders bevorzugt wird, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale durch eine Zweiphotonen-Absorption induziert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein analytisches System zur hochempfindlichen gleichzeitigen Messung nichtlinearer optischer Emissionssignale, orts aufgelöst in einer oder zwei Ortsdimensionen, umfassend:

- mindestens eine Lichtquelle zur Aussendung von Anregungslicht
- technische Hilfsmittel zur Leistungsmodulation und / oder Pulsdauermodulation des von der mindestens einen Lichtquelle ausgehenden Anregungslichts
- ein Wechselwirkungsvolumen oder eine Wechselwirkungsfläche oder eine Wechselwirkungsschicht, gemeinsam bezeichnet als „Wechselwirkungsraum“, worin eine oder mehrere nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte Emissionen angeregt werden können
- mindestens ein ein- oder zweidimensionales Detektor-Array zur Messung des von dem Wechselwirkungsraum ausgehenden Lichts
- einen Computer, auf den die Messdaten besagten Detektor-Arrays übertragen und mithilfe dessen die Messdaten in einer ein- oder mehrdimensionalen Datenmatrix formatiert und analysiert werden

dadurch gekennzeichnet, dass die zur Intensität des in den Wechselwirkungsräumen verfügbaren Anregungslichts linear proportionalen Anteile des von dort ausgehenden Lichts von zur verfügbaren Anregungslichtintensität nichtlinear proportionalen Anteilen des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts getrennt werden.

Für das erfindungsgemässe analytische System bestehen gleichartige mögliche Ausführungsformen und Bevorzugungen wie für das vorangehend beschriebene erfindungsgemässe Verfahren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemässen analytischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens zu quantitativen und / oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik und die Bestimmung von genomischen oder proteomischen Unterschieden im Genom, wie

beispielsweise Einzelnukleotid-Polymorphismen, zur Messung von Protein-DNA-wechselwirkungen, zur Bestimmung von Steuerungsmechanismen für die m-RNA-Expression und für die Protein(bio)synthese, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen, insbesondere zur Bestimmung von biologischen und chemischen Markerstoffen, wie mRNA, Proteinen, Peptiden oder niedermolekularen organischen (Boten-)Stoffen, sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktforschung und -entwicklung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktforschung und -entwicklung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, insbesondere in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Bestandteil der Erfindung ist ausserdem die Verwendung eines erfindungsgemässen analytischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens in der nichtlinearen Optik, der Materialforschung, der Untersuchung von Vorgängen an Phasengrenzen und Oberflächen fester Körper, der Qualitätskontrolle optischer Komponenten, insbesondere für die Laser-Technologie, beispielsweise von frequenzverdoppelnden Komponenten.

Die Erfindung wird nachfolgend beispielhaft, d.h. ohne Einschränkung der Allgemeinheit, weiter erläutert.

Beispiele:

Ein erfindungsgemässes analytisches System umfasst einen Wechselwirkungsraum gemäss der vorgenannten Definition, in dem mit Variationen eines eingestrahnten Anregungslichts nichtlinear korrelierte Antwortsignale erzeugt werden können, ein optisches System zur Anregung und Detektion (mittels eines ein- oder zweidimensionalen Detektorarrays) besagter Antwortsignale, einen Computer, auf den die Detektorsignale übertragen, in einer Datenmatrix abgespeichert und mithilfe dessen dann die Messdaten nach einer erfindungsgemässen Vorschrift in ihre unterschiedlich mit dem Anregungslicht korrelierten Anteile aufgespalten werden.

Ein erfindungsgemässes Verfahren umfasst die Verwendung eines erfindungsgemässen analytischen Systems zur Erzeugung und Detektion von nichtlinear mit einem Anregungslicht korrelierten Antwortsignalen in einem wie oben definierten Wechselwirkungsvolumen und die Aufspaltung der aufgenommenen Messdaten nach ihren unterschiedlich mit dem Anregungslicht korrelierten Anteilen.

Das erfindungsgemässe analytische System und Verfahren werden nachfolgend beispielhaft anhand ihrer genannten Bestandteile, vorwiegend für den speziellen Fall des Nachweises von Lumineszenz induziert durch Zweiphotonen-Anregung erläutert, sind jedoch in allgemeiner Weise auf die Detektion und Quantifizierung nichtlinear mit einem Anregungslicht korrelierter Prozesse anwendbar.

Kurzbeschreibung der Abbildungen:

Figur 1 zeigt als Beispiel eines Wechselwirkungsraumes für die Erzeugung nichtlinear mit einem Anregungslicht korrelierte optische Signale das Schema eines Dünnschichtwellenleiters in Aufsicht, mit Gittern zur Ein- und Auskopplung von Licht in den bzw. aus dem Wellenleiter, zwischen welchen Gittern das Licht im Wellenleiter geleitet wird, und mit auf der Oberfläche erzeugten Messbereichen in Form kreisförmiger Bereiche aufgetragenen Materials (als ganzes bezeichnet als „Sensorplattform“), in denen die Erzeugung nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierter Antwortsignale nachgewiesen werden soll.

Figur 2 zeigt ein geeignetes optisches System zur Erzeugung nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierter Signale, als Bestandteil eines erfindungsgemässen analytischen Systems.

Figur 3 zeigt in einer Fehlfarbandarstellung (Skala am rechten Rand) die von einer Sensorplattform gemäss dem Schema von Figur 1 aufgenommenen Antwortsignale als Überlagerung von 150 Aufnahmen bei modulierter Intensität des Anregungslichts, oben ohne Separation der unterschiedlich mit dem Anregungslicht korrelierten Anteile, unten nach Selektion des nichtlinear korrelierten Antwortsignalanteils nach dem erfindungsgemässen Verfahren.

Figur 4 zeigt Linienprofile der als Bilder in Figur 3 gezeigten Daten längs der Linie $y = 0$, oben vor, unten nach Selektion des nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierten Antwortsignalanteils nach dem erfindungsgemässen Verfahren.

Figur 5 zeigt die Abhängigkeit des räumlichen Rauschens ,ohne und nach Selektion des nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierten Antwortsignalanteils nach dem erfindungsgemässen Verfahren, von der Anzahl für die Analyse berücksichtigter Aufnahmen.

Figur 6 illustriert eine Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens unter Verwendung einer stufenförmigen (4-Schritt-) Modulation des Anregungslichts und einer harmonischen Analyse.

1. Wechselwirkungsraum zur Erzeugung nichtlinear korrelierter optischer Signale

Als Wechselwirkungsraum im Sinne der vorangehenden Definition, in dem nichtlineare optische Signale erzeugt werden sollen, dient die an die Oberfläche eines planaren Dünnschichtwellenleiters angrenzende Schicht, deren laterale Ausdehnung durch die Ausbreitungslänge und -breite eines im Wellenleiters geführten

Anregungslichts und deren Höhe über dem Wellenleiter durch die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes oberhalb des Wellenleiters definiert ist.

Die Wellenleiterstruktur (W) (Figur 1) wird gebildet von einem 150 nm dünnen wellenleitenden Film aus Tantalpentoxid (wellenleitende, optisch transparente Schicht (a), $n = 2.092$ bei 800 nm), der auf einem Glassubstrat (AF45-Glas als optisch transparente Schicht (b), $n = 1.496$ bei 800 nm) aufgebracht ist (Schichtenstruktur in Figur 1 nicht gezeigt). Zur Ein- und Auskopplung von Licht in bzw. aus der wellenleitenden Schicht (a) dienen im Abstand von 9 mm in der Schicht (a) erzeugte Koppelgitter (c, c') in der Form von Reliefgittern (Gitterperiode 360 nm, Gittertiefe 12 nm). Unter diesen Bedingungen beträgt für Anregungslicht von 800 nm Wellenlänge der Einkoppelwinkel vom Glassubstrat zur wellenleitenden Schicht (a), bezogen auf die Normale zur Ebene der Oberfläche der Wellenleiterstruktur, -20.4° ; der äussere Einstrahlwinkel auf die Schicht (b), zur Erfüllung der Einkopplungsbedingung, beträgt -31.4° .

Auf der Wellenleiterstruktur sind zwischen einem ersten, der Einkopplung des Anregungslichts dienenden Koppelgitter (c) (rechts in Figur 1) und einem zweiten, der Auskopplung des im wellenleitenden Film geführten Lichts dienenden Koppelgitter (c') (links in Figur 1) unterschiedliche lumineszenzfähige Farbstoffe in unterschiedlicher Konzentration in diskreten Messbereichen („Spots“, Spotdurchmesser 120 μm , (Zentrum-zu-Zentrum) Spotabstand 350 μm) aufgebracht. Mit (d) sind auf der Wellenleiterstruktur durch Aufbringung von zu untersuchenden Farbstoffen erzeugte Messbereiche bezeichnet, wobei ausgefüllte Kreise unter den Versuchsbedingungen lumineszente Messbereiche und nicht ausgefüllte Kreise nicht lumineszente Messbereiche andeuten. Diese lumineszenzfähigen Farbstoffe sollen auf ihre Möglichkeiten zur Aussendung nichtlinear mit einer modulierten Anregungslichtintensität korrelierter Signale untersucht werden. Mit (e) ist die Spur des in der Schicht (a) geleiteten Anregungslichts angedeutet.

2. Optisches System zur Erzeugung nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierter Signale

Ein geeignetes optisches System zur Erzeugung nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierter Signale, als Bestandteil eines erfindungsgemässen analytischen Systems, ist in Figur 2 dargestellt. Als Anregungslichtquelle (f) dient ein gepulster Titan-Sapphir-Laser mit Emission bei ca. 800 nm (Pulslänge: 100 fsec, Repetitionsrate: 80 MHz, eingesetzte mittlere Leistung: bis 1.5 W, spektrale Pulsbreite: 8 nm, Tsunami Modell 3960, Spectra Physics, Mt. View, CA, USA). Nach Durchgang des Lichts durch eine Strahlformungsoptik (g) kann die Intensität des vom Laser ausgestrahlten Anregungslichts mit einem akustooptischen Modulator (h) (Fused Silica Kristall, 60 MHz Trägerfrequenz, ASM-601-23, IntraAction, Bellwood, IL, USA) kontinuierlich zwischen 0 % und 80 % der Ausgangsleistung reguliert werden. Dabei dient eine Apertur (i) dazu, die nullte Ordnung des transmittierten Lichts nach dem akustooptischen Modulator auszublenden. Alternativ kann mithilfe einer rotierenden Halbwellen-Platte (j) für 800 nm und eines Polarisators (k) die Intensität des Anregungslichts zwischen 0 % und 100 % der Ausgangsleistung reguliert werden. Beide Intensitätsregulierungen können mit einem Computer gesteuert werden.

Nach den alternativ zu verwendenden Komponenten zur Intensitätsregulierung können im Anregungsstrahlengang (in Richtung der Wellenleiterstruktur) Linsen (l), z. B. Zylinderlinsen, eingesetzt werden, um auf dem Einkoppelgitter (c) der Wellenleiterstruktur (W) parallel eingestrahlte Anregungslichtbündel gewünschter Geometrie zu erzeugen. Das eingestrahlte Anregungslicht wird über einen Spiegel umgelenkt auf das Einkoppelgitter (c) der Wellenleiterstruktur, welche auf einem Justierelement montiert ist, welches Translation in x-, y- und z-Richtung (parallel und in den Achsen senkrecht zu den Gitterlinien) und Rotation (mit Drehachse übereinstimmend mit den Gitterlinien des Einkoppelgitters) erlaubt.

Für die nachfolgend berichteten Schritte des Experiments wird der Laserstrahl der Anregungslichtquelle in den meisten Fällen mit einer Zylinderlinse ($f = 40$ mm) senkrecht zu den Gitterlinien kollimiert, so dass auf dem Gitter typischerweise ein elliptischer ausgeleuchteter Bereich von ca. 0.1 mm x 1 mm bis 2 mm (mit langer Achse parallel zu den Gitterlinien) erzeugt wird. Die Halbwertsbreite des in die

wellenleitende Schicht eingekoppelten Anregungslichts beträgt unter diesen Bedingungen typischerweise entsprechend 1 mm bis 2 mm. In einer früheren Arbeit (WO 02/79765) wurde gezeigt, dass unter diesen Bedingungen längs der gesamten Spur des im Wellenleiter geführten Lichts an der Wellenleiteroberflächen Lumineszenzanregung durch Zweiphotonen-Absorption, als ein Spezialfall von nichtlinear mit einem Anregungslicht korrelierten Antwortsignalen, erzeugt werden kann.

Die Intensität des auf das Einkoppelgitter der Wellenleiterstruktur auftreffenden Anregungslichts des gepulsten Lasers (Pulsfrequenz: 80 MHz) wird durch Rotation einer im Anregungsstrahlengang befindlichen Halbwellen-Platte („half-wave plate“) (j) bei konstanter Einstellung eines ebenfalls im Anregungsstrahlengang montierten Polarisators (k) periodisch sinusförmig moduliert. Eine vollständige Drehung der Halbwellen-Platte ist verbunden mit 4 vollständigen, sinusförmigen Modulationsperioden der auf das Einkoppelgitter eintreffenden Anregungslichtintensität. Das von der Wellenleiterstruktur ausgehende Licht wird mit einer Sammeloptik gesammelt und, ohne weitere spektral selektive Komponenten im Emissionsstrahlengang, auf eine CCD-Kamera (m) (AstroCam, TE3/A, Cambridge, GB) als Detektor geleitet. Während einer Umdrehung der Halbwellen-Platte werden etwa 100 Kamerabilder aufgenommen und deren digitale, pixelaufgelöste Daten zur Weiterverarbeitung zu einem Computer geleitet.

Als weitere optionale optische Komponenten sind in Figur 2 ein Interferenzfilter (n) angedeutet, der vor der CCD-Kamera positioniert werden kann, ein optisches Leistungsmessgerät (o), mit dem beispielsweise die Intensität des transmittierten Lichtanteils hinter der Wellenleiterstruktur gemessen werden kann, und ein optisches Spektrometer (p), mit dem beispielsweise das Spektrum des am zweiten Gitter (c') ausgekoppelten Lichts analysiert werden kann. Diese letztgenannten Komponenten sind keine notwendigen Bestandteile eines erfindungsgemässen analytischen Systems.

3. Trennung der unterschiedlich mit der Anregungslichtintensität korrelierten Signalanteile

Zur Umsetzung der Trennung der unterschiedlich mit der Anregungslichtintensität korrelierten Antwortsignalanteile sind gemäss des vorliegenden erfindungsgemässen analytischen Systems und des damit auszuführenden erfindungsgemässen Verfahrens verschiedene Ausführungsformen möglich.

3.1. Parallele Taylor-Entwicklung

Gegeben sei ein Antwortsignal s in Abhängigkeit von der Leistung P eines Anregungslichts in Form einer Taylor-Reihe.

$$s = a_0 + a_1 \cdot P + a_2 \cdot P^2 \quad (1)$$

a_0 ... Hintergrund, a_1 ... lineares Streulicht, a_2 ... nichtlineares Signal

Wenn $s(P)$ für drei verschiedene Leistungen P gemessen wird, lassen sich die Werte für a_0 , a_1 , und a_2 berechnen. Ein Bild von a_2 für jeden Bildpunkt ergibt ein hintergrund- und streulichtfreies Bild des nichtlinear korrelierten Signalanteils (im Spezialfall des durch Zweiphotonen-Ansorption induzierten Lumineszenzsignals).

Wird $s(P)$ für mehr als drei Leistungen gemessen, so lassen sich die Werte für a_0 , a_1 , und a_2 nach einer Ausgleichsrechnung nach dem Gauß'schen Verfahren der kleinsten Quadratabweichung bestimmen. Für den Fall von Gl. (1) ergibt diese Rechnung einen polynomialen Algorithmus, der sich leicht vektorisieren lässt. Damit lassen sich die Koeffizienten a_0 , a_1 , und a_2 für ein ganzes Bild innerhalb kürzester Zeit (in Echtzeit) berechnen.

Wir wählen folgende Bezeichnungen:

$P^{(n)}$... einfallende Leistung, Bild n .

$s_{(x,y)}^{(n)}$... Signal des Bildpunktes (x,y) , Bild n .

$a_{k(x,y)}$... a_0 , a_1 , a_2 Koeffizient des Bildpunktes (x,y) .

Die Anwendung des Gauß'schen Prinzips auf Gl. (1) ergibt:

$$\frac{\partial}{\partial a_{k(x,y)}} \sum_n \left(s_{(x,y)}^{(n)} - a_{0(x,y)} - a_{1(x,y)} P^{(n)} - a_{2(x,y)} P^{(n)^2} \right)^2 = 0 \quad \text{für } k=0, 1, 2 \quad (2)$$

daraus folgt:

$$\begin{cases} a_{0(x,y)} \sum_n 1 + a_{1(x,y)} \sum_n P^{(n)} + a_{2(x,y)} \sum_n P^{(n)^2} = \sum_n s_{(x,y)}^{(n)} \\ a_{0(x,y)} \sum_n P^{(n)} + a_{1(x,y)} \sum_n P^{(n)^2} + a_{2(x,y)} \sum_n P^{(n)^3} = \sum_n P^{(n)} s_{(x,y)}^{(n)} \\ a_{0(x,y)} \sum_n P^{(n)^2} + a_{1(x,y)} \sum_n P^{(n)^3} + a_{2(x,y)} \sum_n P^{(n)^4} = \sum_n P^{(n)^2} s_{(x,y)}^{(n)} \end{cases} \quad (3)$$

und unter Verwendung der folgenden Abkürzung

$$Sp_0 = \sum_n 1 = N, \quad Sp_1 = \sum_n P^{(n)}, \quad \dots, \quad Sp_4 = \sum_n P^{(n)^4} \quad (4)$$

$$Sz_{(x,y)} = \sum_n s_{(x,y)}^{(n)}, \quad Szp_{(x,y)} = \sum_n s_{(x,y)}^{(n)} P^{(n)}, \quad Szp_{2(x,y)} = \sum_n s_{(x,y)}^{(n)} P^{(n)^2} \quad (5)$$

ergibt sich als Lösung

$$L = \begin{pmatrix} a_{0(x,y)} & a_{1(x,y)} & a_{2(x,y)} \end{pmatrix} = \frac{1}{A} \begin{pmatrix} c_{00} & c_{01} & c_{02} \\ c_{10} & c_{11} & c_{12} \\ c_{20} & c_{21} & c_{22} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} Sz_{(x,y)} \\ Szp_{(x,y)} \\ Szp_{2(x,y)} \end{pmatrix} \quad (6)$$

mit

$$A = Sp_2^3 - 2 \cdot Sp_1 \cdot Sp_2 \cdot Sp_3 + Sp_3^2 + Sp_1^2 \cdot Sp_4 - Sp_2 \cdot Sp_4 \quad (7)$$

und

$$c = \begin{pmatrix} (Sp_3 \cdot Sp_3 - Sp_4 \cdot Sp_2) & (Sp_1 \cdot Sp_4 - Sp_2 \cdot Sp_3) & (Sp_2 \cdot Sp_2 - Sp_1 \cdot Sp_3) \\ (Sp_1 \cdot Sp_4 - Sp_3 \cdot Sp_2) & (Sp_2 \cdot Sp_2 - Sp_0 \cdot Sp_4) & (Sp_0 \cdot Sp_3 - Sp_1 \cdot Sp_2) \\ (Sp_2 \cdot Sp_2 - Sp_3 \cdot Sp_1) & (Sp_0 \cdot Sp_3 - Sp_2 \cdot Sp_1) & (Sp_1 \cdot Sp_1 - Sp_0 \cdot Sp_2) \end{pmatrix} \quad (8)$$

Im vorliegenden Beispiel wird mithilfe der parallelen Taylor-Entwicklung eine Serie von 150 CCD-Kamerabildern, jeweils mit einem (geometrisch identischen) Bildausschnitt von 100 x 400 Bildpunkten, analysiert. Dieses bedeutet die Erstellung von 40 000 quadratischen Fits für 6 000 000 Datenwerte. Die Auswertung erfolgt durch einfache Matrizenmultiplikation innerhalb eines Bruchteils einer Sekunde mit heute handelsüblichen Computern. Die Ergebnisse der Analyse sind in den Figuren 3 bis 5 dargestellt.

Von Vorteil ist, dass bei Verwendung derselben Leistungsvariation $P^{(n)}$ nur der Vektor $\{Sz_{(x,y)}, Szp_{(x,y)}, Szp2_{(x,y)}\}$ neu berechnet werden muss. Die Matrix $\{c_{ij}\}$, deren Berechnung relativ zeitaufwendig ist, und der Faktor A bleiben konstant und müssen nicht neu berechnet werden, selbst wenn das Messobjekt gewechselt wird oder wenn an einem Messobjekt mehrere gleiche Zyklen $P^{(n)}$ gemessen werden, um durch Mittelung der resultierenden Lösungsvektoren L das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern.

Der obere Teil von Figur 3 zeigt den Mittelwert einer Serie von 150 Kamerabildern, die während 1.5 Drehungen der Halbwellen-Platte aufgenommen wurden. Ein gleichartiges Bild ergibt sich in etwa bei Aufnahme eines einzigen Bildes mit entsprechend langer Belichtungszeit, bei der, ohne Modulation der Anregungslichtintensität, die gleiche Gesamtleistung des Anregungslichts eingestrahlt wird. Zu erkennen sind ausschliesslich Streulichtanteile des Anregungslichts, auf der rechten Seite ($x = 0$ mm) am Einkoppelgitter, auf der linken Seite ($x = -9$ mm) am Auskoppelgitter, dazwischen längs der Spur des im wellenleitenden Film geführten Lichts. Der eingestrahlte Laserstrahl war in diesem Fall auf etwa 1 mm parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet.

Der untere Teil von Figur 3 zeigt die gleiche gemittelte Bildserie, nachdem mithilfe der vorangehend beschriebenen Methode der parallelen Taylor-Entwicklung die linear und die nicht mit dem modulierten Anregungslicht korrelierten Signalanteile entfernt wurden. Zu erkennen sind deutlich mindestens 9 Spots mit immobilisierten Farbstoffmolekülen, von denen eine nichtlineare Emission, in diesem Falle eine durch Zweiphotonen-Absorption angeregte Lumineszenz, ausgeht. Diese orts aufgelöst detektierte Emission stammt aus dem Anteil von im evaneszenten Feld des Wellenleiters angeregter Lumineszenz, welcher weitgehend isotrop in den umgebenden Raum abgestrahlt wird.

Ein erheblicher Anteil von im evaneszenten Feld angeregter Lumineszenz koppelt in den Wellenleiter zurück und wird dort geleitet, wobei es für die Ausbreitung im Wellenleiter keine Vorzugsrichtung gibt. Die in diesem Teil von Figur 3 im Bereich der Koppelgitter erkennbaren Signale entsprechen wahrscheinlich dem Anteil in den

Wellenleiter rückgekoppelter Lumineszenz nach Zweiphotonen-Anregung, der an besagten Koppelgittern wieder ausgekoppelt wird.

Figur 4 zeigt Linienprofile der digitalisierten Messwerte von Figur 3 parallel zur x-Achse von Figur 3 für $y = 0$ mm. Im oberen Linienprofil ist keinerlei spezifisches Signal, sondern nur starkes Streulicht mit einer hohen räumlich statistischen Variation erkennbar. Im unteren Linienprofil sind, neben den Signalen von den Koppelgittern (bei $x = -9$ mm und $x = 0$ mm) deutlich die nichtlinearen Signale aus 3 Messbereichen (Spots) erkennbar (bei $x = -7.3$ mm, $x = -3$ mm und $x = -1.8$ mm). Ausserdem ist noch eine schwächere Emission (bei $x = -7$ mm) desselben Farbstoffs wie bei $x = -7.3$ mm erkennbar, der hier in niedrigerer Konzentration immobilisiert wurde (schwach auch im unteren Teil von Figur 3 erkennbar).

Figur 5 verdeutlicht die Leistungsfähigkeit des erfindungsgemässen analytischen Verfahrens anhand der erreichten Verminderung des „räumlichen Signalrauschens“. Dabei wird unter dem „räumlichen Signalrauschen“ die lokale Variation der Signale, ohne Einfluss eines spezifischen Emissionssignals verstanden, d.h. das Rauschen des Streu- und Hintergrundlichts. Zur Erstellung dieser Graphik wurde eine zunehmende Anzahl von Bildern, bis zu einem Maximum von 150 Bildern, für die Analyse berücksichtigt (d.h. gemittelt). Analysiert wurde der Bereich zwischen $x = -6$ mm und $x = -4$ mm (entlang $y = 0$ mm) aus Figur 3, in dem keine nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierten spezifischen Emissionen festgestellt worden waren. Die Anzahl berücksichtigter Bilder führt bei der Mittelung der Daten ohne Separation in die unterschiedlich mit dem Anregungslicht korrelierten Anteile zu keinerlei Verminderung des Rauschens ($\sigma_{avg} = const$). Es ist lediglich möglich, durch längere Belichtungszeiten und höhere Integrationszeiten das zeitliche Signalrauschen zu vermindern (hier nicht analysiert). Demgegenüber führt die Separation der unterschiedlich mit dem Anregungslicht korrelierten Signalanteile mithilfe der parallelen Taylor-Entwicklung, gemäss dem erfindungsgemässen Verfahren, zu einer immer stärkeren Verminderung des Rauschens der nichtlinear korrelierten Signalanteile bei Berücksichtigung einer grösseren Anzahl von Bildern. Bei Berücksichtigung von 150 Bildern wurde bereits eine Verminderung des Rauschens

um einen Faktor 25 erreicht. Dieser Verbesserungsfaktor kann bei Berücksichtigung einer grösseren Anzahl von Bildern noch weiter erhöht werden.

3.2. Harmonische Analyse

Ein anderer Ansatz wird bei der harmonischen Analyse gewählt. Sie beruht darauf, dass nichtlineare Systeme bei harmonischer Anregung (Modulation bei konstanter Frequenz) Oberwellen erzeugen. Die Parameter dieser Oberwellen können durch Fourier-Analyse bestimmt werden. So eine Fourier-Analyse lässt sich ebenfalls für Bilderserien vektorisieren und als einfache Matrizenmultiplikation durchführen, wie im Fall der Analyse beruhend auf paralleler Taylor-Entwicklung beschrieben. Linear mit dem Anregungslicht korrelierte Signale, beispielsweise von Streulicht, tragen nicht zu höheren Harmonischen bei. Mithilfe dieser Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens lassen sich beispielsweise bei Detektion der zweiten Harmonischen streulichtfreie Bilder von durch Zweiphotonen-Absorption induzierten Lumineszenzsignalen anfertigen.

3.3. 4-Schritt Algorithmus

Eine besonders einfach in die Praxis umsetzbare Variante der Ausführungsform unter Verwendung der harmonischen Analyse beruht auf der Anwendung eines 4-Schritt Algorithmus. In dieser Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wird die Leistung des Anregungslichts nicht kontinuierlich bei einer Frequenz moduliert, sondern periodisch in Stufen auf 4 diskrete Werte gesetzt. Der zeitliche Verlauf der Signalmodulation (hier gemessen in der Anzahl sequentiell aufgenommener Kamerabilder des Antwortsignals) ist in Figur 6 dargestellt. Ausgedrückt in relativen Einheiten, wird die auf den Wechselwirkungsraum einwirkende Intensität des Anregungslichts sequentiell auf die Werte 0, 1, 2 und 1 eingestellt. Diesem Anregungslichtprofil folgen die linear korrelierten Antwortsignalanteile (z.B. von Streulicht), ausgedrückt in relativen Einheiten, in gleicher Weise (0, 1, 2, 1 entsprechend nicht skalierten Werten a, b, c, d), wie in Figur 6 durch die eng schraffierten Flächen dargestellt. Beispielsweise die Anteile von quadratisch mit dem

Anregungslicht korrelierten Emissionen (wie z. B. Lumineszenz nach Zweiphotonen-Absorption), folgen der Anregungslichtintensität, wiederum ausgedrückt in relativen Einheiten, mit den Werten (0, 1, 4, 1) entsprechend nicht skalierten Werten a' , b' , c' , d' ; weit schraffierte Flächen in Figur 6).

Aus Figur 6 wird deutlich ersichtlich, dass das bei der Grundfrequenz (ω) dieser stufenförmigen Modulation des Anregungslichts detektierte Antwortsignal sowohl linear als auch nichtlinear (in diesem Fall quadratisch) mit dem Anregungslicht korrelierte Anteile enthält. Demgegenüber enthält das bei der zweiten Harmonischen (2ω) detektierte Signal keine linear korrelierten Anteile (z. B. von Streulicht) mehr, wie aus der Detailbetrachtung der Funktionsweise dieser Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ersichtlich wird:

Die zu den verschiedenen Zeitpunkten, korreliert mit der Grundfrequenz bzw. der zweiten Harmonischen gemessenen Antwortsignalwerte, (0, 1, 2, 1) bzw. (0, 1, 4, 1) werden entsprechend der Fourier-Analyse mit $\cos(\omega t)$ bzw. $\cos(2\omega t)$ multipliziert und die Produkte anschliessend summiert..

Der Zeitnullpunkt sei dabei bei Aufnahme der Signalanteile c bzw. c' gewählt. Diese \cos -Werte ergeben dann für die Grundwelle die Werte (-1, 0, 1, 0) und für die zweite Harmonische die Werte (1, -1, 1, -1), mit denen die Signalwerte zu multiplizieren sind. Die Ausführung dieser Multiplikation der Messwerte mit den \cos -Werten, zusammen mit der Bildung der Summen, zur Bestimmung der Fourier-Koeffizienten, für die linear korrelierten Signalanteile (bezeichnet als „lineare Signale“ in der Tabelle) und die nichtlinear (hier quadratisch) korrelierten Signalanteile (bezeichnet als „nichtlineare Signale“ in der Tabelle) ist in Tabellenform in Figur 6 wiedergegeben. Hieraus wird ersichtlich, wie, dieser Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens folgend, die linear mit dem Anregungslicht korrelierten Anteile bei Detektion entsprechend der zweiten Harmonischen eliminiert werden.

Für die Anwendung in der Praxis ist es von wesentlichem Vorteil, dass die \cos -Werte bei 2ω abwechselnd -1 und +1 sind, d.h., dass sich die Fourier-Analyse auf einfaches, abwechselndes Addieren und Subtrahieren der Signalwerte reduziert, was den Aufwand der numerischen Analyse wesentlich vermindert. Auch wenn diese Variante hier nur am Beispiel der numerischen Behandlung für einen einzelnen Messort

demonstriert ist, lässt sich selbstverständlich diese Variante des erfindungsgemässen Verfahrens auf ein- oder zweidimensionale Bilder anwenden, welche bei einer entsprechenden stufenförmigen Modulation des Anregungslichts aufgenommen und deren Daten bei der zweiten Harmonischen der Modulationsfrequenz analysiert werden. Insbesondere bei einer grossen Anzahl von Bildpunkten erweist sich der äusserst einfache Algorithmus als besonders vorteilhaft.

Für eine quantitative Analyse müssen die Signalwerte der einzelnen Bildpunkte anschliessend noch entsprechend skaliert werden. Soll beispielsweise der skalierte Signalwert dem mittleren Signal eines 4-Stufen Zyklus (0, 1, 2, 1) entsprechen, welches bei der ersten Stufe gemessen wird, so beträgt der Skalierungsfaktor $\frac{3}{4N}$, wobei N die Anzahl der Messzyklen ist:

$$S_{avg} = a_2 \frac{0^2 + 1^2 + 2^2 + 1^2}{4} = \frac{3}{2} \cdot a_2$$

$$S_{4\text{-Stufen}} = a_2(0^2 - 1^2 + 2^2 - 1^2)N = 2N \cdot a_2 \quad (9)$$

Soll der skalierte Signalwert dem Signal entsprechen, welches man für eine konstante Leistung messen würde, die der mittleren Leistung eines ganzen 4-Schritt Zyklus entspricht, so beträgt der Skalierungsfaktor $\frac{1}{2N}$:

$$S_{avg} = a_2 \left(\frac{0+1+2+1}{4} \right)^2 = a_2$$

$$S_{4\text{-Stufen}} = a_2(0^2 - 1^2 + 2^2 - 1^2)N = 2N \cdot a_2 \quad (10)$$

3.3.1. Korrekturfaktoren für den 4-Schritt Algorithmus

Für den Fall, dass die eingestellte Anregungsleistung, welche zu den linear korrelierten Signalanteilen b und d führt, nicht exakt dem Mittelwert der Anregungsleistungen mit den resultierenden Signalanteilen a und c entspricht, können linear korrelierte Signalanteile (z.B. Streulicht) nicht vollständig mit der Methode des 4-Schritt Algorithmus unterdrückt werden. Eine einfache Weiterentwicklung der speziellen Variante des erfindungsgemässen Verfahrens besteht dann darin, die den

Bildern entsprechenden Daten vor Durchführung der Addition/Subtraktion mit einem Korrekturfaktor zu multiplizieren. Die entsprechenden Korrekturfaktoren für die Aufnahme der Messdaten a, b, c, d müssen für eine Messanordnung nur einmal bestimmt werden.

Im folgenden werden die Multiplikationsfaktoren für die 4 Stufen (+1,-1,+1,-1) durch die Korrekturfaktoren $\{c_a, c_b, c_c, c_d\}$ ersetzt.

Für den Fall, dass es möglich ist, die effektive Anregungsleistung bei den 4 Stufen, P_a, P_b, P_c, P_d zu messen, lassen sich die Korrekturfaktoren folgendermassen bestimmen:

Das Hintergrundlicht ist nicht korreliert mit dem Anregungslicht. Damit lautet die Bedingung zur Elimination des Hintergrundlichts, d.h. die zugehörige Filterbedingung:

$$(11.i) \quad c_a + c_b + c_c + c_d = 0$$

Demgegenüber ist das Streulicht linear mit dem Anregungslicht korreliert, so dass die entsprechende Filterbedingung lautet:

$$(11.ii) \quad c_a P_a + c_b P_b + c_c P_c + c_d P_d = 0$$

Die Gleichung für die Signalskalierung (im Falle der Lumineszenz nach Zweiphotonen-Absorption, welche quadratisch mit dem Anregungslicht korreliert ist) lautet:

$$(11.iii) \quad c_a P_a^2 + c_b P_b^2 + c_c P_c^2 + c_d P_d^2 = (P_a^2 + P_b^2 + P_c^2 + P_d^2) / 3$$

Auf der rechten Seite von Gleichung (11.iii) wird anstelle des arithmetischen Mittelwerts (Division durch 4) ein um 4/3 höherer Wert verwendet. Die Ursache ist die hier gewählte Signalnormierung (siehe Gleichung (9)); die Normierung kann jedoch auch anders gewählt werden.

Damit sind drei Bedingungen zur Bestimmung von 4 Unbekannten gegeben. Das System ist so also noch unterbestimmt. Diesen noch bestehenden Freiheitsgrad kann man beispielsweise benutzen, um das zeitliche Rauschen zu minimieren. Dieses ist

gleichbedeutend mit der Minimierung der Summe der Quadrate der Beiträge, so dass alternativ die Bedingungen (11.iv.a) für die Rauschunterdrückung des Hintergrundlichts oder (11.iv.b) für die Rauschunterdrückung des Streulichts als vierte Bedingungen zur Bestimmung der vier Korrekturfaktoren verwendet werden können:

$$(11.iv.a) \quad c_a^2 + c_b^2 + c_c^2 + c_d^2 \rightarrow \min$$

$$(11.iv.b) \quad c_a P_a^2 + c_b P_b^2 + c_c P_c^2 + c_d P_d^2 \rightarrow \min$$

Für den Fall, dass die Korrekturfaktoren aus gemessenen Bilddaten bestimmt werden sollen, kann in einem entsprechenden Bildbereich, in dem keine nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte Signale erfasst sein sollten, die Analyse unter Benutzung der Bedingung (11.iv.b) durchgeführt werden. Vorteilhaft ist, wenn in diesem Bildbereich die Signale eines Streukörpers erfasst sind. Durch iterative Variation werden die Koeffizienten derart angepasst, dass die Signalwerte a_2 des 4-Stufen Algorithmus im Kalibrationsbereich gegen 0 konvergieren, die linearen Anteile a_1 am Streukörper gegen endliche Werte, im übrigen Kalibrationsbereich gegen 0 konvergieren, und die Hintergrundwerte a_0 gegen einen konstanten Wert, oder gegen einen möglichst glatten Verlauf, oder gegen die Dunkelfeldwerte des Detektorsystems konvergieren. Je nach Anwendungsfall lassen sich die Konvergenzkriterien unterschiedlich definieren. Die hier genannte Vorgehensweise ist daher nicht als von allgemeiner Natur, sondern nur als ein mögliches Beispiel zu verstehen.

3.4. Alternative Techniken

Nachfolgend werden alternative Techniken beschrieben, welche ebenfalls den nichtlinearen Charakter der Zweiphotonen-Absorption und ausgewählte Modulationsverfahren benutzen, um Hintergrundlicht und Streulicht effizient zu unterdrücken.

3.4.1. Pulsdauermodulation

Für die meisten Anwendungen ist die Verwendung von gepulsten Lichtquellen (modengekoppelten Lasern) wegen deren hoher Spitzenleistungen von Vorteil: Zum Zeitpunkt des Lichtpulses stehen für einen kurzen Zeitraum sehr hohe Anregungsleistungen zur Verfügung, welche ausreichend sind zur Anregung nichtlinear korrelierter Antwortsignale. Insbesondere wenn die Pulsdauer sehr kurz im Vergleich zum Zeitraum zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen ist, kann aber trotzdem eine hohe Belastung der Probe (des Wechselwirkungsraumes) durch Anregungslicht vermieden werden, da die einwirkende zeitliche Durchschnittsintensität des Anregungslichts relativ niedrig eingestellt werden kann.

Eine andere mögliche Ausführungsform eines erfindungsgemässen analytischen Systems und damit auszuführenden erfindungsgemässen Verfahrens beruht darauf, nicht die Intensität des auf den Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts zu variieren, sondern die Pulsdauer, beispielsweise über ein Element mit einstellbarer Dispersion der Gruppenlaufzeit (GDD, group delay dispersion). Die Variation der Gruppenlaufzeit und damit die Variation der Pulsdauer bei gleichbleibender Pulsenergie kann beispielsweise mittels eines Gires-Tournois-Interferometer- (GTI) Spiegels mit elektrisch steuerbarer optischer Dicke erfolgen.

In den Fällen der vorangehend beschriebenen Beispiele beruht Trennung von linear und nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierten sowie unkorrelierten Signalen darauf, dass unter den Versuchsbedingungen das Streulicht proportional zur Anregungslichtleistung und Lumineszenz nach deren Anregung durch Zweiphotonen-Absorption proportional zum Quadrat der Anregungslichtleistung ist. Für gepulste Anregung ist dieses gültig, wenn die Leistungsmodulation durch variable Abschwächung oder Verstärkung des ganzen Pulszuges erfolgt, ohne die Pulsdauer oder die Wiederholrate der Pulse zu verändern.

Vorteilhaft wird die Modulation der Pulsdauer so durchgeführt, dass das Integral der Pulsleistung während der Pulse konstant bleibt, d.h. dass beispielsweise bei kürzeren Pulsen die Spitzenleistung entsprechend erhöht wird. Unter diesen Voraussetzungen

ist das Streulicht unabhängig von der Spitzenleistung, und eine durch Zweiphotonenanregung induzierte Lumineszenz ist dann linear proportional zur Puls-Spitzenleistung. Folglich ist das gesuchte Signal im Fall der parallelen Taylor-Entwicklung dann durch den Koeffizienten a_1 statt a_2 gegeben. Im Fall der harmonischen Analyse ist das gesuchte Signal unter diesen Bedingungen mit der Grundfrequenz moduliert. Ein Vorteil dieser Variante des erfindungsgemässen Verfahrens ist beispielsweise, dass aufgrund der konstanten mittleren Intensität mögliche thermische Effekte, aufgrund möglicher Absorption des mit hoher Intensität eingestrahlten Anregungslichts, ebenfalls konstant sind und damit zu keiner Beeinflussung der Resultate in komplexerer Weise führen.

Ein weiterer Vorteil ist, dass man im Fall der Zweiphotonen-Absorption, bei Verwendung einer stufenförmigen Modulation des Anregungslichts sogar mit nur 2 Stufen (Pulsdauern), anstelle von 4 Stufen, arbeiten kann. Bei Anwendung des 2-Stufen Algorithmus werden, in analoger Weise wie vorangehend für den 4-Stufen Algorithmus beschrieben, die den Einzelbildern entsprechenden Signalwerte ebenfalls abwechselnd addiert und subtrahiert. Auf diese Weise können ebenfalls die durch Zweiphotonen-Absorption ausgelösten Signale selektiert und die Streulicht- und Hintergrundsignalanteile unterdrückt werden.

3.4.2. Doppelstrahl-Anregung

Als eine weitere mögliche Variante eines erfindungsgemässen analytischen Systems und damit auszuführenden erfindungsgemässen Verfahrens zeichnet sich eine Doppelstrahl-Anregung dadurch aus, dass (im Falle der Zweiphotonen-Anregung) die beiden gleichzeitig zu absorbierenden Photonen nicht notwendigerweise von der gleichen Lichtquelle (Laser) stammen und nicht notwendigerweise dieselbe Wellenlänge haben müssen. Wirken zwei ausreichend starke Laserstrahlen gleichzeitig auf den Wechselwirkungsraum ein, so ergeben sich drei Beiträge zu einer Zweiphotonen-Absorption: ein Beitrag ist proportional zum Quadrat der Intensität des ersten Anregungsstrahls, ein zweiter Beitrag proportional zum Quadrat der Intensität des zweiten Anregungsstrahl, und ein dritter Beitrag ist proportional zum Produkt der

Intensitäten des ersten und des zweiten Anregungsstrahls. Dabei können die Wirkungsquerschnitte (die Grössen) der drei Beiträge unterschiedlich sein. Es ist beispielsweise möglich, dass nur einer der drei Beiträge von signifikanter Grösse ist.

Wenn die beiden Anregungslichtstrahlen die (unterschiedlichen) Wellenlängen λ_1 und λ_2 haben, so ergibt sich die Anregungsenergie des entsprechenden Zweiphotonen-Absorptionsprozesses aus der Summe der Einzelphotonenenergien. Somit erhält man für die Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = (\frac{1}{\lambda_1} + \frac{1}{\lambda_2})^{-1}$. Vorteilhaft ist, wenn einer der beiden Laser in der Wellenlänge abstimmbar ist (d.h. eine variable Emissionswellenlänge besitzt). Dann lassen sich verschiedene Analyten spezifisch anhand ihrer Zweiphotonen-Absorptionswellenlänge nachweisen, indem einer der beiden auf den Wechselwirkungsraum einwirkenden Lichtstrahlen in seiner Wellenlänge variiert wird.

Damit gleichzeitig je ein Photon aus den beiden Laserstrahlen absorbiert werden kann, müssen im Fall von zwei gepulsten Laserquellen beide Pulse zeitlich und räumlich im Wechselwirkungsraum vorhanden sein. Ist nun einer der beiden Laser, beispielsweise ein durchstimmbarer Laser, ein Dauerstrichlaser (d.h. kontinuierlich emittierend), so ist die notwendige zeitliche Überlappung automatisch gewährleistet. Dabei können die eingesetzten Anregungslichtintensitäten beispielsweise so ausgewählt sein, dass mithilfe des einen, gepulsten Lasers die notwendige Spitzenleistung für effiziente Zweiphotonenabsorption bereitgestellt wird, während der Dauerstrichlaser für die Energieselektion des Absorptionsüberganges (entsprechend der vorangehenden Summenbildung für die resultierende Anregungswellenlänge) eingesetzt wird.

Die in Abschnitt 3.1 bis 3.3 beschriebenen Verfahren lassen sich auch in Kombination mit einer Doppelstrahl-Anregung durchführen. Dabei soll nur Lumineszenz aus dem Beitrag der gemischten Zweiphotonen-Absorption sichtbar gemacht werden. Streulicht, sowie Lumineszenz aus den beiden Beiträgen der Einzelstrahl Zweiphotonen-Absorption, sofern vorhanden, sollen unterdrückt werden. Einer

speziellen Variante des erfindungsgemässen Verfahrens folgend, werden die Intensitäten P_1 und P_2 der beiden Strahlen unabhängig voneinander moduliert. Die Abhängigkeit des gemessenen Signals lautet dann:

$$s = a_0 + u_1 \cdot P_1 + v_1 \cdot P_2 + u_2 \cdot P_1^2 + v_2 \cdot P_2^2 + a_2 P_1 P_2 \quad (11)$$

Gesucht ist der Koeffizient a_2 für jeden Bildpunkt (x,y) .

Im Fall der parallelen Taylor-Entwicklung lautet das zu lösende Gleichungssystem:

$$\frac{\partial}{\partial X_{(x,y)}} \sum_n \left(s_{(x,y)}^{(n)} - a_{0(x,y)} - u_{1(x,y)} P_1^{(n)} - v_{1(x,y)} P_2^{(n)} - u_{2(x,y)} P_1^{(n)^2} - v_{2(x,y)} P_2^{(n)^2} - a_{2(x,y)} P_1^{(n)} P_2^{(n)} \right)^2 = 0$$

mit $X \dots a_0, u_1, v_1, u_2, v_2, a_2$ (12)

Im Fall der harmonischen Analyse werden P_1 und P_2 vorteilhaft mit unterschiedlichen Frequenzen ω_1 und ω_2 moduliert. Das gesuchte Signal a_2 kann dann sowohl bei der Summenfrequenz ($\omega_1 + \omega_2$) als auch bei der Differenzfrequenz ($\omega_1 - \omega_2$) detektiert werden.

Im Fall des 4-Stufen Algorithmus wird vorteilhaft die Intensität der beiden Strahlen P_1 und P_2 entsprechend den Werten (0,0,1,1) und (0,1,0,1) moduliert. Daraus ergibt sich als ein wesentlicher Vorteil, dass anstelle von akusto-optischen, elektro-optischen oder polarisationsbasierenden Modulatoren einfache, mechanische Verschlüsse, beispielsweise rotierende „Chopper“ verwendet werden können. Indem mit diesen mechanischen „Choppern“ lediglich der Lichtweg alternierend blockiert und freigegeben wird, kann, als ein weiterer Vorteil gegenüber den zuvor genannten Arten von Modulatoren das Problem von Veränderungen der Stahllage und der Fokussierung, welches sich bei Verwendung dieser Modulatoren ergeben kann, gänzlich vermieden werden. Ausserdem sind mit einem Chopper die theoretisch optimalen Leistungen „0%“ und „100%“ Transmission sehr gut realisierbar. Eine 50% Leistungsstufe entfällt hier.

Die Auswertung der 4 Bilder erfolgt durch Summation mit den Koeffizienten $\{+1, -1, -1, +1\}$. Analog zu Abschnitt 3.3 und Figur 6 ergeben sich somit für die Beiträge eines 4-Stufen Zyklus von $a_0, u_1, v_1, u_2, v_2, a_2$:

$$\begin{aligned}
 a_0: & (+1) + (-1) + (-1) + (+1) = 0 \\
 u_1: & (0) + (0) + (-1) + (+1) = 0 \\
 v_1: & (0) + (-1) + (0) + (+1) = 0 \\
 u_2: & (0) + (0) + (-1) + (+1) = 0 \\
 v_2: & (0) + (-1) + (0) + (+1) = 0 \\
 a_2: & (0) + (0) + (0) + (+1) = 1
 \end{aligned} \tag{13}$$

Als weitere Variante von Ausführungsformen der Erfindung basierend auf einer Doppelstrahl-Technik kann die Modulation der Intensität eines oder beider Strahlen durch die Modulation eines anderen Strahlparameters, beispielsweise der Pulsdauer oder der räumlichen Position, ersetzt werden.

4. Anwendung auf weitere nichtlineare optische Prozesse

Verschiedene Ausführungsformen eines erfindungsgemässen analytischen Systems und damit auszuführender Verfahren wurden vorangehend vor allem an Beispielen zur Anwendung auf Lumineszenzanregung durch Zweiphotonen-Absorption erläutert. Die Erfindung ist jedoch auch auf andere nichtlineare optische Prozesse anwendbar, wie im folgenden demonstriert werden soll.

4.1. Mehrphotonenanregung

Bei Mehrphotonenanregung ist die Abhängigkeit des Lumineszenzsignals von der Anregungsleistung gegeben durch

$$s = a_0 + a_1 \cdot P + a_m \cdot P^m \tag{14}$$

wenn m Photonen gleichzeitig absorbiert werden. Eine Anregung durch Mehrphotonen-Absorption der Ordnung m entspricht dann einer linearen Absorption

(Einphotonen-Absorption) bei einer Wellenlänge $\lambda_{ex} = \lambda_L / m$, wenn die Wellenlänge des Anregungslasers λ_L beträgt. Bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm können Mehrphotonen-Absorptionen durch entsprechend ausgewählte Farbstoffe oder Chromophoren also mit Übergangsenergien entsprechend Wellenlängen von 800 nm, 400 nm, 267 nm, 200 nm, usw. erfolgen.

Die Umsetzung der parallelen Talyor-Entwicklung erfolgt analog zu Abschnitt 3.1 oder 3.4.1. Dabei lassen sich entsprechend die Anteile von Lumineszenz nach Ein-, Zwei-, Drei-, m-Photonenabsorption trennen. Der Anteil von Einphotonen-Absorption lässt sich dabei nicht von linear mit der Anregungslichtintensität korreliertem Anregungsstreulicht trennen. Alle übrigen Anteile höherer Ordnung (entsprechend Mehrphotonen-Prozessen) können jedoch vom Streulicht sowie untereinander separiert werden.

Bei Verwendung der harmonischen Analyse muss beachtet werden, dass Prozesse unterschiedlicher Ordnung, die gleichzeitig auftreten, meistens nicht in einfacher Form separierbar sind. Die durch Fünfphotonen Absorption induzierte Lumineszenz beispielsweise enthält Fourier-Komponenten bei der Modulationsfrequenz des Anregungslichtes ω , sowie bei den Harmonischen 2ω , 3ω , 4ω und 5ω . Die Signalstärke nimmt ausserdem mit zunehmender Ordnung der Harmonischen ab. Daraus folgt, dass ein Detektionssystem für m-Photonenabsorption am besten bei der zweiten Harmonischen betrieben werden soll. Ausserdem sollte möglichst kein Licht von anderen nichtlinearen Prozessen vom Detektionssystem registriert werden. Falls dennoch nichtlinear-optische Signale der Ordnung k vom Detektor gemessen werden, sollte die harmonische Analyse bei der $k+1$ -ten Harmonischen erfolgen. Trivialerweise muss natürlich $m \geq k+1$ gelten.

Die Methode der Modulation und Signalaufnahme mittels eines 4-Stufen Algorithmus kann ohne Änderung von Zweiphotonen-Prozessen auf Mehrphotonenprozesse übertragen werden. Lediglich die Skalierungsfaktoren für die Signale müssen angepasst werden.

Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist auch, dass bei Detektion von m -Photonenabsorption bis zu m Laserstrahlen verwendet werden, um eine selektive Analyse analog zur vorangehend beschriebenen Anordnung der Doppelstrahlanregung zu realisieren.

4.2. Frequenzverdopplung, Summen- und Differenzfrequenzerzeugung

Vorangehend wurden Anwendungen auf solche Prozesse vorgestellt, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als „resonante Prozesse“ bezeichnet werden sollen. Darunter sollen solche Prozesse verstanden werden, durch die ein real existierender Zustand, beispielsweise ein angeregter Zustand eines Moleküls oder Chromophoren, erreicht (angeregt) wird (z. B. durch Multiphotonen-Absorption), welcher Zustand dann nach einer endlichen, wenn meist auch kurzen Zeitdauer beispielsweise durch Emission von Licht wieder zerfällt. Im Gegensatz dazu sollen als „nicht-resonante Prozesse“ solche Prozesse verstanden werden, bei denen ein angeregter Zustand nicht real existiert, sondern rein virtueller Natur ist. Dieses bedingt, dass der virtuelle, angeregte Zustand quasi instantan wieder zerfallen muss, wobei zusätzliche Randbedingungen für Richtung und Impuls der beteiligten Lichtstrahlen berücksichtigt werden müssen.

Für die Erzeugung und Analyse der Signale entsprechend der vorliegenden Erfindung spielt es dabei aber keine Rolle, ob beim Anregungsprozess virtuelle oder reale Prozesse beteiligt sind. Die erfindungsgemässen analytischen Systeme und damit auszuführenden Verfahren können, in analoger Weise auf die Signalerzeugung, -detektion und -analyse von nichtlinearen Prozessen, welche zu real existierenden oder zu virtuellen angeregten Zuständen führen, angewendet werden.

Dabei ist beispielsweise für die Analyse von Frequenzverdopplung („Second-Harmonic Generation“) in gleicher Weise wie vorangehend für die

Lumineszenzerzeugung durch Zweiphotonen-Absorption, bei Einstrahl-Anregung, vorzugehen. Die in den Abschnitten 3.1. bis 3.3. beschriebenen Varianten des erfindungsgemässen Verfahrens können hierauf direkt, ohne Änderung, übertragen werden.

Eine Anordnung und Analyse zur Summenfrequenzerzeugung können analog zu der in Abschnitt 3.4.2. beschriebenen Variante der Doppelstrahl-Anregung betrieben werden.

Eine beispielhafte Anwendung für eine zwei-dimensionale nicht-linear optische Signaldetektion ist die Messung der Homogenität von Frequenzverdopplungskristallen. Üblicherweise ist der Winkel zwischen dem Lichtstrahl des Anregungslasers und dem erzeugten, frequenzverdoppelten Lichtstrahl null oder sehr klein, so dass eine räumliche Trennung der beiden Lichtstrahlen kaum möglich ist. Zur selektiven Detektion der verdoppelten Signale mithilfe herkömmlicher Anordnungen und Verfahren müssen daher hochwirksame Spektralfilter eingesetzt werden, oder es wird die Verwendung spektral dispersiver Elemente (Gitter, Prisma) erforderlich, wobei dann nur noch eine Raumdimension orts aufgelöst werden kann, während eine Erzeugung zweidimensionaler Bilder nicht mehr möglich ist. Ein weiterer Nachteil der herkömmlichen Anordnungen und Verfahren ist ausserdem, dass meistens das Anregungslicht in den Kristall fokussiert werden muss, um die erforderliche Intensität zur effizienten Frequenzverdopplung zu erreichen. Zur Erzeugung einer zweidimensionalen Darstellung der Erzeugung der frequenzverdoppelten Signale ist dann ein Scannen des fokussierten Anregungslichts über die Querschnittsfläche des Kristalls erforderlich. Dieses ist nicht nur mit einem höheren Zeitaufwand verbunden, sondern birgt in sich inherent auch noch die Unsicherheit, dass schwer zwischen Inhomogenitäten des frequenzverdoppelnden Kristalls und Änderungen des optischen Lichtweges für verschiedene Fokussierungspunkte in der Scan-Ebene als Ursache für mögliche Variationen des frequenzverdoppelten Signals unterschieden werden kann.

Mit Hilfe des erfindungsgemässen analytischen Systems und Verfahrens wäre es möglich, einen Kristall mit einem aufgeweiteten Anregungslichtstrahl zu durchleuchten und ein zweidimensionales Bild der an unterschiedlichen Regionen des Kristalls erzeugten, frequenzverdoppelten Signale, zu detektieren. Infolge der Strahlaufweitung werden für eine solche Anordnung die frequenzverdoppelten Signale in der Regel sehr klein und mit starken Anteilen des Anregungslichtes versehen sein. Gerade für diese Problemstellung sind die hier beschriebenen Detektionsverfahren entwickelt worden. Für die Trennung der unterschiedlich mit dem Anregungslicht korrelierten Signalanteile eignen sich alle der vorgenannten Ausführungsformen der Erfindung. Vorzugsweise wird man für diese spezielle Anwendung, in der das Verhältnis zu erwartender frequenzverdoppelter Signalanteile und von Signalanteilen der der eingestrahlten Grundfrequenz besonders ungünstig ist, eine Ausführungsform der Erfindung in Kombination mit einer solchen spektralen Filterung, z. B. mithilfe eines Bandpass-Filters, bei der die orts aufgelöste Information über die Signalverteilung erhalten bleibt, einsetzen.

Ansprüche:

1. Verfahren zur hochempfindlichen gleichzeitigen Messung nichtlinearer optischer Emissionssignale, orts aufgelöst in einer oder zwei Ortsdimensionen, umfassend:

- Einstrahlung des Anregungslichts von mindestens einer Lichtquelle in einer leistungsmodulierten und / oder pulsdauermodulierten Form in ein Wechselwirkungsvolumen oder zu einer Wechselwirkungsfläche oder einer Wechselwirkungsschicht (zusammengefasst unter der Bezeichnung "Wechselwirkungsräume"), in welchen Wechselwirkungsräumen jeweils eine oder mehrere nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte Emissionen angeregt werden können,
- Messung des von besagten Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts mit einem ein- oder zweidimensionalen Detektor-Array,
- Übertragung der Messdaten von besagtem Detektor-Array auf einen Computer und Formatierung der Daten in einer ein- oder mehrdimensionalen Datenmatrix, dadurch gekennzeichnet, dass die zur Intensität des in den Wechselwirkungsräumen verfügbaren Anregungslichts linear proportionalen Anteile des von dort ausgehenden Lichts von zur verfügbaren Anregungslichtintensität nichtlinear proportionalen Anteilen des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts getrennt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es keine spektrale Filterung des zu detektierenden, von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es in Kombination mit einer spektralen Filterung des zu detektierenden, von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes ein- oder zweidimensionale Detektor-Array ausgewählt ist aus der Gruppe, welche CCD-Kameras, CCD-Chips, CMOS-Kameras, CMOS-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannel-Plates und Vielkanal-Photomultiplier umfasst, wobei eine phasensensitive Demodulation in besagtem Detektor-Array integriert sein kann.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahnten Anregungslichts mittels opto-mechanischer und / oder akusto-optischer und / oder elektro-optisch aktiver Hilfsmittel erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass besagte opto-mechanische und / oder akusto-optische und / oder elektro-optisch aktiven Hilfsmittel ausgewählt sind aus der Gruppe, welche mechanische Shutter und rotierende Chopper, welche jeweils alternierend den Lichtweg zwischen der Anregungslichtquelle und dem Wechselwirkungsraum blockieren und freigeben, polarisationsselektive Komponenten wie beispielsweise rotierende Halbwellen-Platten in Kombination mit Polarisatoren, Flüssigkristall-Abschwächer, elektro-optisch aktive Kristalle, in ihrer Transmission örtlich oder zeitlich variable Neutraldichte-Filter, akusto-optische Modulatoren sowie Modulatoren, die auf Interferenzeffekten beruhen, wie beispielsweise Michelson-Interferometer oder Mach-Zehnder-Interferometer, umfasst.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahnten Anregungslichts mittels direkter, aktiver Modulation des von der Anregungslichtquelle ausgestrahlten Lichts erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahnten Anregungslichts mittels Modulation des Anregungsstromes für einen Halbleiterlaser als Anregungslichtquelle erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahnten Anregungslichts periodisch erfolgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts nicht-periodisch erfolgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts in der Modulation der eingestrahlten Intensität besteht.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts in der gleichzeitigen Modulation der Pulsdauer und der Spitzenleistung des eingestrahlten Anregungslichts besteht, wobei vorzugsweise die Spitzenleistung invers proportional zur Pulsdauer variiert wird und besonders bevorzugt das Integral der Pulsleistung konstant bleibt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 12, dadurch gekennzeichnet, dass es ohne Detektion des modulierten Anregungslichts oder einer dazu proportionalen Messgrösse erfolgt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 12, dadurch gekennzeichnet, dass es neben der Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts die Detektion des modulierten Anregungslichts oder einer dazu proportionalen Messgrösse umfasst.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts zeitlich korreliert mit der Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts mit einer Frequenz erfolgt, die einem ganzzahligen Vielfachen der Modulationsfrequenz der Anregungslichtleistung entspricht.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer parallelen Reihenentwicklung erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer parallelen Taylor-Entwicklung erfolgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer harmonischen Analyse erfolgt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mittels einer stufenförmigen Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen unter Verwendung eines 4-Stufen-Algorithmus zur Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 21, dadurch gekennzeichnet, dass experimentell bedingte Abweichungen der Anregungslichtleistungen von den für die Modulation vorgesehenen Sollwerten mittels numerischer Korrekturen kompensiert werden.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 – 22, dadurch gekennzeichnet, dass die unter Anwendung eines 4-Stufen Algorithmus zur Modulation gemessenen Antwortsignale mit Korrekturfaktoren multipliziert werden.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Korrekturfaktoren für die Antwortsignale aus gemessenen Anregungslichtleistungen für die Erzeugung besagter Antwortsignale bestimmt werden.
25. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Korrekturfaktoren für die Antwortsignale durch eine numerische Analyse der erzeugten Antwortsignaldaten bestimmt werden, wobei dieses beispielsweise durch Auswertung der Signale aus hierfür ausgewiesenen Teilbereichen eines Wechselwirkungsraumes oder mithilfe separater Messungen (beispielsweise unter Verwendung einer Kalibrationsprobe) erfolgen kann.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen in Echtzeit zeitgleich (innerhalb der Aufzeichnungszeit für die Signalaufnahme) mit der Aufnahme der Signale aus dem Wechselwirkungsraum erfolgt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Wechselwirkungsraum um eine Wechselwirkungsschicht an einer Oberfläche eines festen Trägers handelt, wobei die flächige Ausdehnung des Wechselwirkungsraumes (auf besagter Oberfläche dieses Trägers) durch die Wechselwirkungsfläche mit dem auftreffenden leistungsmodulierten Anregungslicht und seine Tiefe (Ausdehnung senkrecht zu besagter Oberfläche des Trägers) durch die Reichweite der modulierten Anregungslichtintensität in dieser Raumdimension senkrecht zu dieser Oberfläche des Trägers definiert sind.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass sich innerhalb des Wechselwirkungsraumes Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen befinden, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können.
29. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers einer oder mehrere spezifische Bindungspartner zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Bindungsassay (unter Bindung des Bindungspartners aus einer zugeführten Lösung an den immobilisierten Bindungspartner) immobilisiert sind, wobei der Analytnachweis anhand eines nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten optischen Antwortsignals des immobilisierten Bindungspartners selbst oder des in Lösung zugeführten Bindungspartners oder eines oder mehrerer weiterer, in einem oder mehreren zusätzlichen Verfahrensschritten zugeführter Bindungspartner, erfolgt.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche des besagten festen Trägers immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um den einen oder die mehreren Analyten selbst handelt, welche eingebettet in eine native Probenmatrix oder in einer mit einem oder mehreren Aufbereitungsschritten modifizierten Form der Probenmatrix immobilisiert sind.
31. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche des besagten festen Trägers immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung eines oder mehreren in einer zugeführten Probe befindlicher Analyten handelt.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 – 31, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Bindungspartner, d.h. die selbst immobilisierten nachzuweisenden

oder in einer zugeführten Probe nachzuweisenden Analyten und / oder deren immobilisierte oder in einem zugeführten Nachweisreagens zugeführte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ausgewählt sind aus der Gruppe, welche Proteine, beispielsweise mono- oder polyklonale Antikörper und Antikörperfragmente, Peptide, Enzyme, Glycopeptide, Oligosaccharide, Lektine, Antigene für Antikörper, mit zusätzlichen Bindungsstellen funktionalisierte Proteine („Tag-Proteinen“, wie beispielsweise „Histidin-Tag-Proteinen“) sowie Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotide) und Nukleinsäureanalogue (z. B. PNA), Aptamere, membrangebundene und isolierte Rezeptoren und deren Liganden, durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürliche und künstliche Polymere, etc. umfasst.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 32, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers aufgebrachte Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder aufgebrachte spezifische Bindungspartner in diskreten Messbereichen (Spots) immobilisiert sind, welche eine beliebige Geometrie, beispielsweise kreisförmige, ovale, dreieckige, rechteckige, polygonartige Form etc. haben können, wobei ein einzelner Messbereich gleichartige oder unterschiedliche Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen oder spezifische Bindungspartner enthalten kann.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass diskrete Messbereiche durch räumlich selektive Aufbringung von Verbindungen oder Stoffen oder molekularen Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder von

spezifischen Bindungspartnern auf besagtem festen Träger erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, welche "Ink jet spotting", mechanisches Spotting, „micro contact printing“, fluidische Kontaktierung der Bereiche für die zu erschaffenden Messbereiche mit den zu immobilisierenden Verbindungen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen, sowie photochemische und photolithographische Immobilisierungsverfahren umfasst.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 – 34, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen oder in unbesetzten Teilbereichen innerhalb dieser Messbereiche gegenüber den Analyten und / oder gegenüber seinen Bindungspartnern "chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, welche Albumine, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifische, polyklonale oder monoklonale, artfremde oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten und deren Bindungspartner unspezifische Antikörper (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 -, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierende, fragmentierte natürliche oder synthetische DNA, wie beispielsweise Extrakte von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladene, aber hydrophile Polymere, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, umfassen.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 35, dadurch gekennzeichnet, dass an der Oberfläche besagten festen Trägers aufgebrachte Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder aufgebrachte spezifische Bindungspartner direkt oder mittels eines

sogenannten Spacers ("Abstandshalter", ausgebildet als eigenständiges Molekül oder molekulare Gruppe) an der Oberfläche besagten festen Trägers immobilisiert sind unter Ausnutzung einer oder mehrerer Arten von Wechselwirkungen aus der Gruppe von Wechselwirkungen, welche hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen und kovalente Bindung umfasst.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 36, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Oberfläche besagten festen Trägers und den immobilisierten Verbindungen oder Stoffen oder molekularen Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder den aufgetragenen spezifischen Bindungspartnern eine Haftvermittlungsschicht aufgebracht ist, welche vorzugsweise eine Dicke von weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm hat, und welche vorzugsweise eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, welche Silane, funktionalisierte Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Mehrfachschichten", Thiole, Alkylphosphate und -phosphonate, multifunktionelle Block-Copolymere, wie beispielsweise Poly(L)ysin/Polyethylenglycole, umfassen.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 – 37, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers in einer 2-dimensionalen Anordnung mehr als 10, bevorzugt mehr als 100, besonders bevorzugt mehr als 1000 Messbereiche auf einem Quadratzentimeter angeordnet sind.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 38, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger bei der Wellenlänge des einwirkenden Anregungslichts optisch transparent ist.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 39, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger im wesentlichen planar ist.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 40, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger eine optische Wellenleiterstruktur, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfasst.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 41, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger einen durchgehenden oder in diskrete wellenleitende Bereiche aufgeteilten planaren optischen Wellenleiter, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfasst.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 42, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger einen planaren optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer im wesentlichen optisch transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer zweiten, ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und gegebenenfalls einer ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Zwischenschicht (b') zwischen Schicht (a) und Schicht (b) mit ebenfalls niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfasst.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 – 43, dadurch gekennzeichnet, dass eine wellenleitende Schicht besagten festen Trägers mit einem oder mehreren optischen Koppelementen in optischem Kontakt steht, welche die Einkopplung von Anregungslicht in die besagte wellenleitende Schicht ermöglichen, wobei besagte optische Koppelemente ausgewählt sind aus der Gruppe von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der besagten wellenleitenden Schicht der Evaneszentfeld-Sensorplattform angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 – 44, dadurch gekennzeichnet, dass in einer wellenleitenden Schicht des festen Trägers eine oder mehrere Gitterstrukturen (c) ausgeprägt sind, welche die Einkopplung von Anregungslicht ermöglichen.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 – 45, dadurch gekennzeichnet, dass in einer wellenleitenden Schicht des festen Trägers eine oder mehrere Gitterstrukturen (c') mit gleicher oder unterschiedlicher Gitterperiode und Gittertiefe wie Gitterstrukturen (c) ausgeprägt sind, welche die Auskopplung von in besagter wellenleitender Schicht geführtem Licht ermöglichen.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 46, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale die Signale einer Frequenzverdopplung („second harmonic generation“), Summen- oder Differenzfrequenzerzeugung umfassen.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 47, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale durch eine Multiphotonen-Absorption induziert werden.
49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale durch eine Zweiphotonen-Absorption induziert werden.
50. Analytisches System zur hochempfindlichen gleichzeitigen Messung nichtlinearer optischer Emissionssignale, orts aufgelöst in einer oder zwei Ortsdimensionen, umfassend:
- mindestens eine Lichtquelle zur Aussendung von Anregungslicht
 - Technische Hilfsmittel zur Leistungsmodulation und / oder Pulsdauermodulation des von der mindestens einen Lichtquelle ausgehenden Anregungslichts
 - ein Wechselwirkungsvolumen oder eine Wechselwirkungsfläche oder eine Wechselwirkungsschicht, gemeinsam bezeichnet als „Wechselwirkungsraum“,

worin eine oder mehrere nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte Emissionen angeregt werden können

- mindestens ein ein- oder zweidimensionales Detektor-Array zur Messung des von dem Wechselwirkungsraum ausgehenden Lichts
- einen Computer, auf den die Messdaten besagten Detektor-Arrays übertragen und mithilfe dessen die Messdaten in einer ein- oder mehrdimensionalen Datenmatrix formatiert und analysiert werden

dadurch gekennzeichnet, dass die zur Intensität des in den Wechselwirkungsräumen verfügbaren Anregungslichts linear proportionalen Anteile des von dort ausgehenden Lichts von zur verfügbaren Anregungslichtintensität nichtlinear proportionalen Anteilen des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts getrennt werden.

51. Analytisches System nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass es keine Komponenten für eine spektrale Filterung des zu detektierenden, von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts umfasst.
52. Analytisches System nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich Komponenten für eine spektrale Filterung des zu detektierenden, von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts umfasst.
53. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 52, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine ein- oder zweidimensionale Detektor-Array ausgewählt ist aus der Gruppe, welche CCD-Kameras, CCD-Chips, CMOS-Kameras, CMOS-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannel-Plates und Vielkanal-Photomultipliern umfasst, wobei eine phasensensitive Demodulation in besagtes Detektor-Array integriert sein kann.
54. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 53, dadurch gekennzeichnet, dass besagte technische Hilfsmittel zur Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts ausgewählt sind aus der Gruppe, welche opto-mechanische, akusto-optische und elektro-optisch aktive Hilfsmittel umfasst.

55. Analytisches System nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass besagte opto-mechanische und / oder akusto-optische und / oder elektro-optisch aktiven Hilfsmittel ausgewählt sind aus der Gruppe, welche mechanische Shutter und rotierende Chopper, welche jeweils alternierend den Lichtweg zwischen der Anregungslichtquelle und dem Wechselwirkungsraum blockieren und freigeben, polarisationsselektive Komponenten wie beispielsweise rotierende Halbwellen-Platten in Kombination mit Polarisatoren, Flüssigkristall-Abschwächer, elektro-optisch aktive Kristalle, in ihrer Transmission örtlich oder zeitlich variable Neutraldichte-Filter, akusto-optische Modulatoren sowie Modulatoren, die auf Interferenzeffekten beruhen, wie beispielsweise Michelson-Interferometer oder Mach-Zehnder-Interferometer, umfasst.
56. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts mittels direkter, aktiver Modulation des von der Anregungslichtquelle ausgestrahlten Lichts erfolgt.
57. Analytisches System nach Anspruch 56, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts mittels Modulation des Anregungsstromes für einen Halbleiterlaser als Anregungslichtquelle erfolgt.
58. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 - 57, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts periodisch erfolgt.
59. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 - 57, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahlten Anregungslichts nicht-periodisch erfolgt.
60. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum

eingestrahltten Anregungslichts in der Modulation der eingestrahltten Intensität besteht.

61. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Modulation des zu einem Wechselwirkungsraum eingestrahltten Anregungslichts in der gleichzeitigen Modulation der Pulsdauer und der Spitzenleistung des eingestrahltten Anregungslichts besteht, wobei vorzugsweise die Spitzenleistung invers proportional zur Pulsdauer variiert wird und besonders bevorzugt das Integral der Pulsleistung konstant bleibt.
62. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 61, dadurch gekennzeichnet, dass keine Detektion des modulierten Anregungslichts oder einer dazu proportionalen Messgrösse erfolgt.
63. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 61, dadurch gekennzeichnet, dass neben der Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts eine Detektion des modulierten Anregungslichts oder einer dazu proportionalen Messgrösse erfolgt.
64. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 - 63, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts zeitlich korreliert mit der Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt.
65. Analytisches System nach Anspruch 64, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des von den Wechselwirkungsräumen ausgehenden Lichts mit einer Frequenz erfolgt, die einem ganzzahligen Vielfachen der Modulationsfrequenz der Anregungslichtleistung entspricht.
66. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer

parallelen Reihenentwicklung, bevorzugt mithilfe einer parallelen Taylor-Entwicklung, erfolgt.

67. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mithilfe einer harmonischen Analyse erfolgt.
68. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen mittels einer stufenförmigen Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt.
69. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten Antwortsignalanteile aus dem Wechselwirkungsraum von den übrigen Signalanteilen unter Verwendung eines 4-Stufen-Algorithmus zur Modulation der Anregungslichtleistung erfolgt.
70. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 69, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Wechselwirkungsraum um eine Wechselwirkungsschicht an einer Oberfläche eines festen Trägers handelt, wobei die flächige Ausdehnung des Wechselwirkungsraumes (auf besagter Oberfläche dieses Trägers) durch die Wechselwirkungsfläche mit dem auftreffenden leistungsmodulierten Anregungslicht und seine Tiefe (Ausdehnung senkrecht zu besagter Oberfläche des Trägers) durch die Reichweite der modulierten Anregungslichtintensität in dieser Raumdimension senkrecht zu dieser Oberfläche des Trägers definiert sind.
71. Analytisches System nach Anspruch 70, dadurch gekennzeichnet, dass sich innerhalb des Wechselwirkungsraumes Verbindungen oder Stoffe oder

molekulare Teilgruppen befinden, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können.

72. Analytisches System nach Anspruch 70, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers einer oder mehrere spezifische Bindungspartner zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Bindungsassay (unter Bindung des Bindungspartners aus einer zugeführten Lösung an den immobilisierten Bindungspartner) immobilisiert sind, wobei der Analytnachweis anhand eines nichtlinear mit der Anregungslichtleistung korrelierten optischen Antwortsignals des immobilisierten Bindungspartners selbst oder des in Lösung zugeführten Bindungspartners oder eines oder mehrerer weiterer, in einem oder mehreren zusätzlichen Verfahrensschritten zugeführter Bindungspartner, erfolgt.
73. Analytisches System nach Anspruch 72, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche des besagten festen Trägers immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um den einen oder die mehreren Analyten selbst handelt, welche eingebettet in eine native Probenmatrix oder in einer mit einem oder mehreren Aufbereitungsschritten modifizierten Form der Probenmatrix immobilisiert sind.
74. Analytisches System nach Anspruch 72, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche des besagten festen Trägers immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung eines oder mehreren in einer zugeführten Probe befindlicher Analyten handelt.
75. Analytisches System nach einem der Ansprüche 72 – 74, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Bindungspartner, d.h. die selbst immobilisierten nachzuweisenden oder in einer zugeführten Probe nachzuweisenden Analyten und / oder deren immobilisierte oder in einem zugeführten Nachweisreagens

zugeführte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ausgewählt sind aus der Gruppe, welche Proteine, beispielsweise mono- oder polyklonale Antikörper und Antikörperfragmente, Peptide, Enzyme, Glycopeptide, Oligosaccharide, Lektine, Antigene für Antikörper, mit zusätzlichen Bindungsstellen funktionalisierte Proteine („Tag-Proteinen“, wie beispielsweise „Histidin-Tag-Proteinen“) sowie Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotide) und Nukleinsäureanalogue (z. B. PNA), Aptamere, membrangebundene und isolierte Rezeptoren und deren Liganden, durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürliche und künstliche Polymere, etc. umfasst.

76. Analytisches System nach einem der Ansprüche 71 - 75, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers aufgebrachte Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen, welche unter Einwirkung des Anregungslichts zur Emission damit nichtlinear korrelierter optischer Signale fähig sind, oder mit deren Hilfe, nach deren Wechselwirkung mit weiteren im Wechselwirkungsraum anwesenden Verbindungen, nichtlinear mit dem Anregungslicht korrelierte optische Signale erzeugt werden können, oder aufgebrachte spezifische Bindungspartner in diskreten Messbereichen (Spots) immobilisiert sind, welche eine beliebige Geometrie, beispielsweise kreisförmige, ovale, dreieckige, rechteckige, polygonartige Form etc. haben können, wobei ein einzelner Messbereich gleichartige oder unterschiedliche Verbindungen oder Stoffe oder molekulare Teilgruppen oder spezifische Bindungspartner enthalten kann.
77. Analytisches System nach Anspruch 76, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagten festen Trägers in einer 2-dimensionalen Anordnung mehr als 10, bevorzugt mehr als 100, besonders bevorzugt mehr als 1000 Messbereiche auf einem Quadratcentimeter angeordnet sind.

78. Analytisches System nach einem der Ansprüche 70 – 77, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger bei der Wellenlänge des einwirkenden Anregungslichts optisch transparent ist.
79. Analytisches System nach einem der Ansprüche 70 – 78, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger im wesentlichen planar ist.
80. Analytisches System nach einem der Ansprüche 70 – 79, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger eine optische Wellenleiterstruktur, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfasst.
81. Analytisches System nach einem der Ansprüche 70 – 80, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger einen durchgehenden oder in diskrete wellenleitende Bereiche aufgeteilten planaren optischen Wellenleiter, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfasst.
82. Analytisches System nach einem der Ansprüche 70 – 81, dadurch gekennzeichnet, dass besagter fester Träger einen planaren optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer im wesentlichen optisch transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer zweiten, ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und gegebenenfalls einer ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Zwischenschicht (b') zwischen Schicht (a) und Schicht (b) mit ebenfalls niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfasst
83. Analytisches System nach einem der Ansprüche 80 – 82, dadurch gekennzeichnet, dass eine wellenleitende Schicht besagten festen Trägers mit einem oder mehreren optischen Koppelementen in optischem Kontakt steht, welche die Einkopplung von Anregungslicht in die besagte wellenleitende Schicht ermöglichen, wobei besagte optische Koppelemente ausgewählt sind aus der Gruppe von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der besagten wellenleitenden Schicht der Evaneszentfeld-Sensorplattform

angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern.

84. Analytisches System nach einem der Ansprüche 80 – 83, dadurch gekennzeichnet, dass in einer wellenleitenden Schicht des festen Trägers eine oder mehrere Gitterstrukturen (c) ausgeprägt sind, welche die Einkopplung von Anregungslicht ermöglichen.
85. Analytisches System nach einem der Ansprüche 80 – 84, dadurch gekennzeichnet, dass in einer wellenleitenden Schicht des festen Trägers eine oder mehrere Gitterstrukturen (c') mit gleicher oder unterschiedlicher Gitterperiode und Gittertiefe wie Gitterstrukturen (c) ausgeprägt sind, welche die Auskopplung von in besagter wellenleitender Schicht geführtem Licht ermöglichen.
86. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 85, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale die Signale einer Frequenzverdopplung („second harmonic generation“), Summen- oder Differenzfrequenzerzeugung umfassen.
87. Analytisches System nach einem der Ansprüche 50 – 86, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale durch eine Multiphotonen-Absorption induziert werden.
88. Analytisches System nach Anspruch 87, dadurch gekennzeichnet, dass besagte nichtlinear mit der Anregungslichtintensität korrelierte optische Emissionssignale durch eine Zweiphotonen-Absorption induziert werden.
89. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 – 49 und / oder eines analytischen Systems nach einem der Ansprüche 50 – 88 zu quantitativen und / oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung,

der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik und die Bestimmung von genomischen oder proteomischen Unterschieden im Genom, wie beispielsweise Einzelnukleotid-Polymorphismen, zur Messung von Protein-DNA-wechselwirkungen, zur Bestimmung von Steuerungsmechanismen für die m-RNA-Expression und für die Protein(bio)synthese, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen, insbesondere zur Bestimmung von biologischen und chemischen Markerstoffen, wie mRNA, Proteinen, Peptiden oder niedermolekularen organischen (Boten-)Stoffen, sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktforschung und -entwicklung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktforschung und -entwicklung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, insbesondere in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

90. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 – 49 und / oder eines analytischen Systems nach einem der Ansprüche 50 – 88 in der nichtlinearen Optik, der Materialforschung, der Untersuchung von Vorgängen an Phasengrenzen und Oberflächen fester Körper, der Qualitätskontrolle optischer Komponenten, insbesondere für die Laser-Technologie, beispielsweise von frequenzverdoppelnden Komponenten.

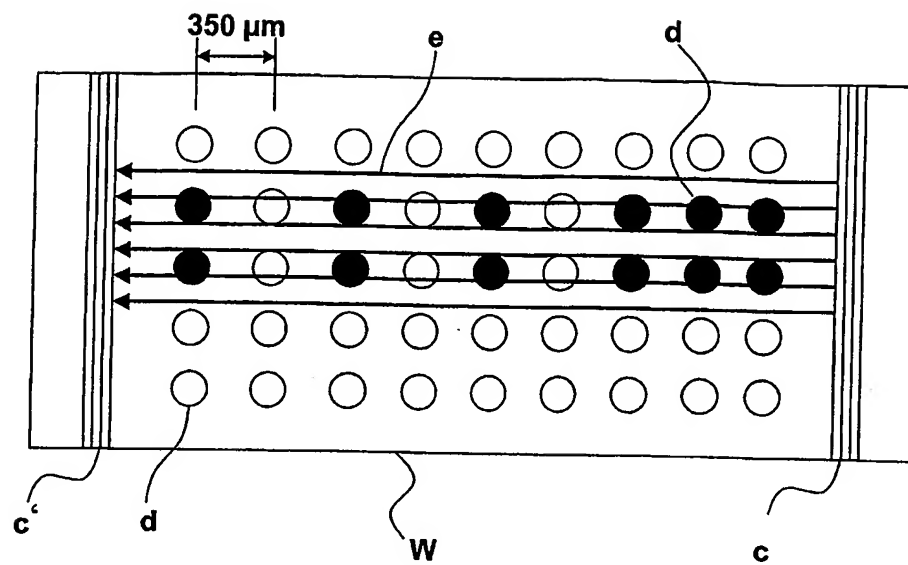


Fig. 1

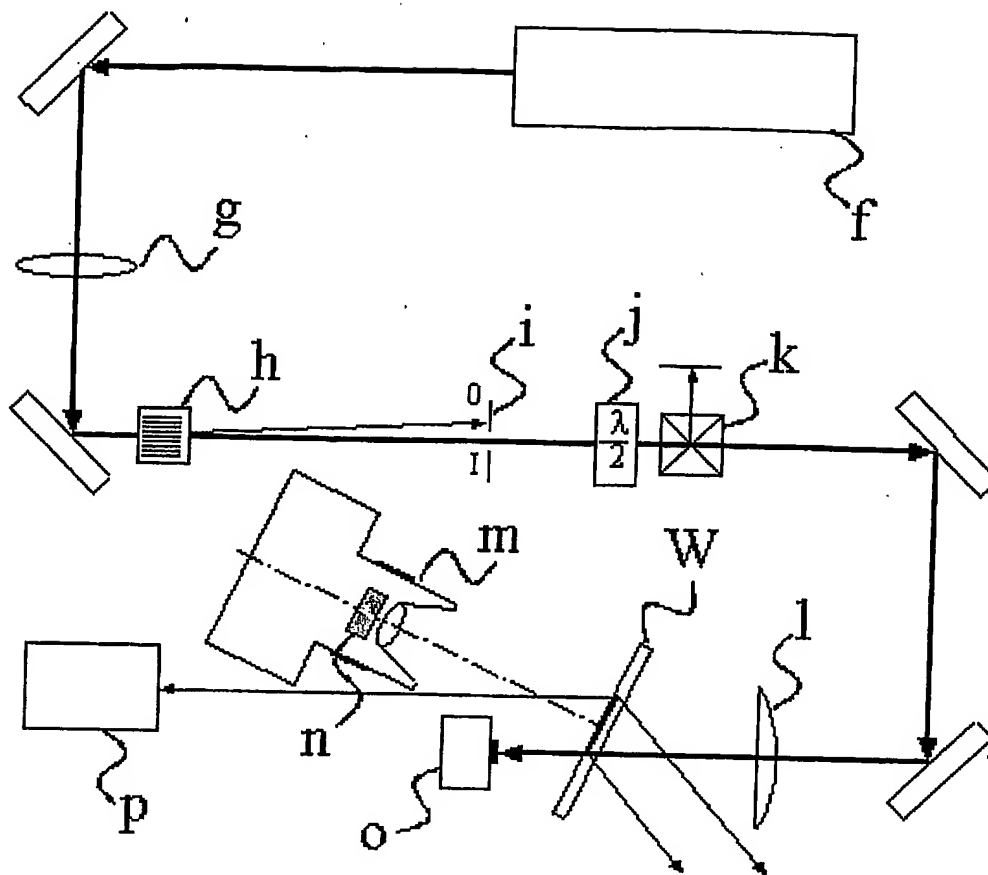


Fig. 2

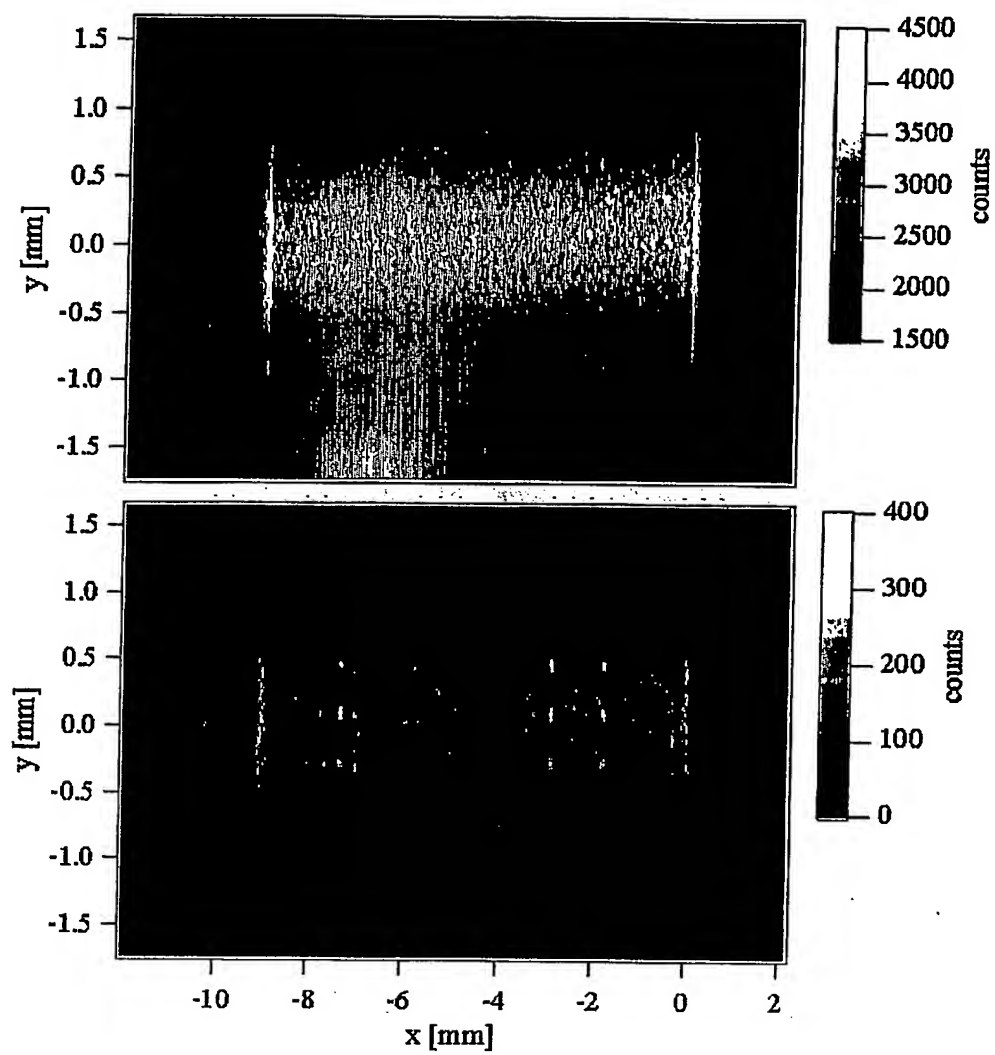


Fig. 3

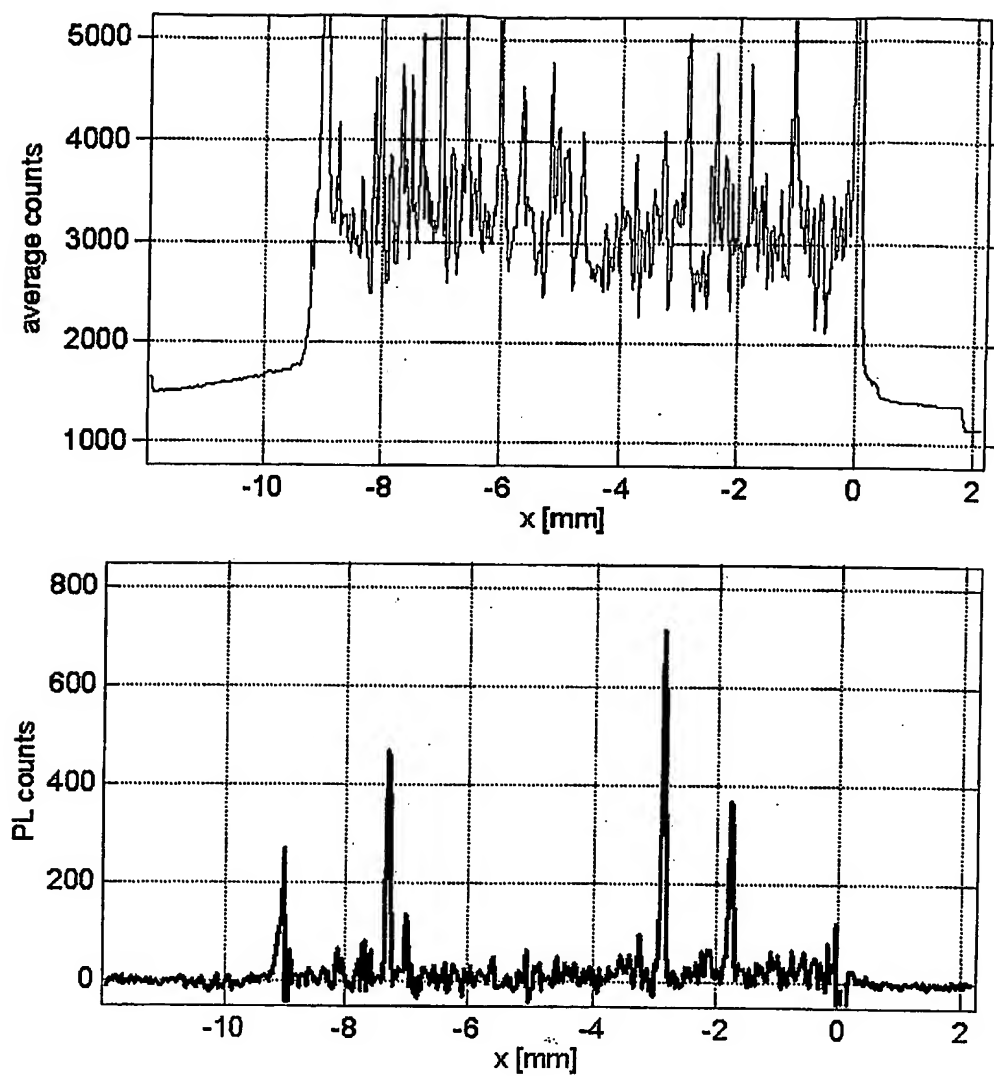


Fig. 4

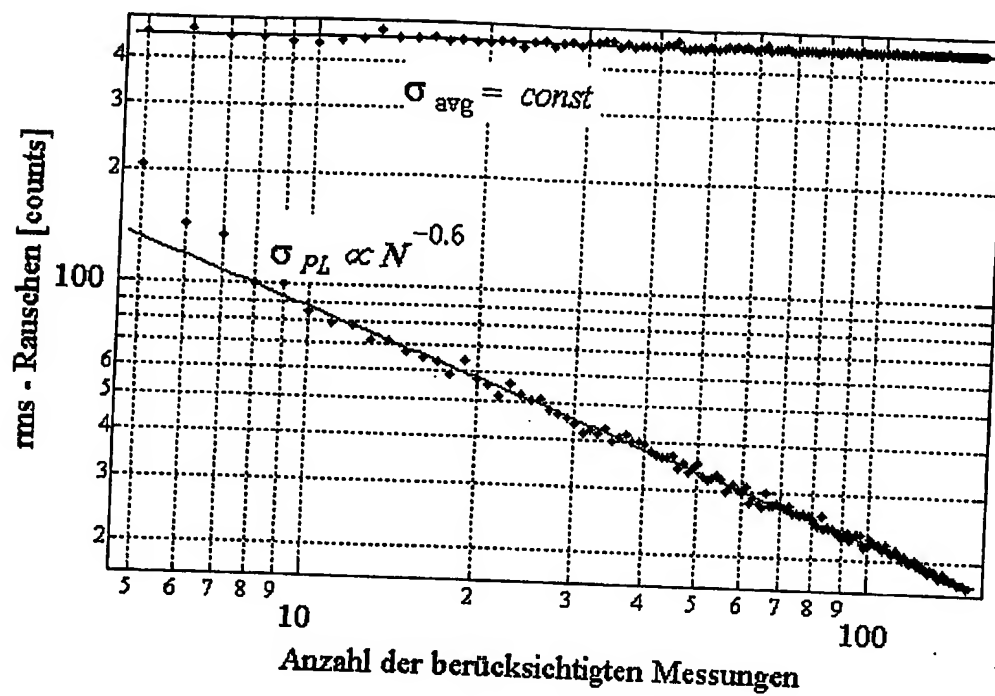


Fig. 5

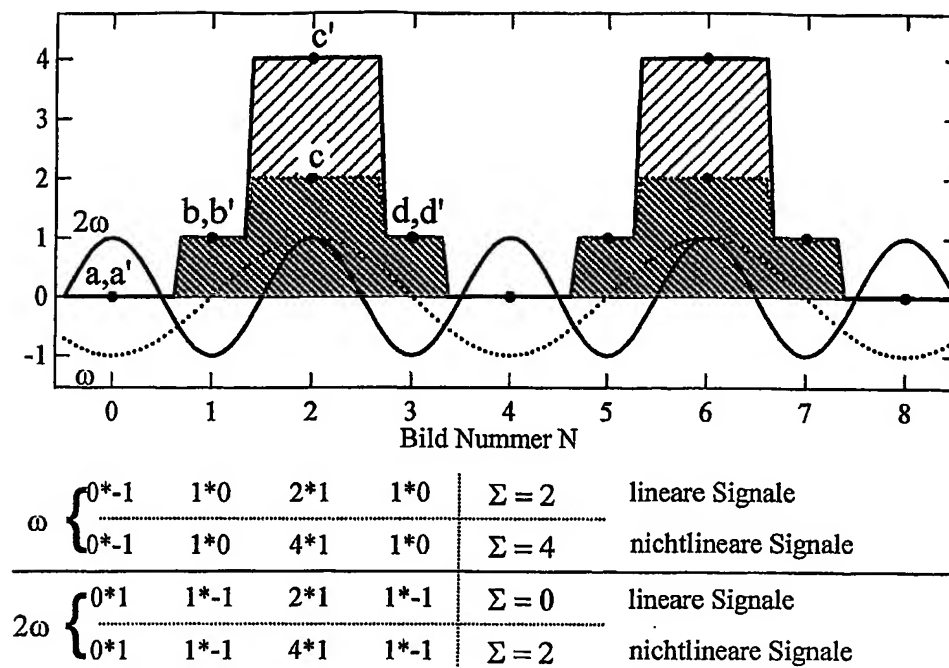


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

EP/2004/007176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, INSPEC, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/71028 A (PHOTOGEN INC) 30 November 2000 (2000-11-30) page 32 - page 34; claim 14; figure 12 page 41 - page 42	1-90
A	WO 02/054071 A (SALAFSKY JOSHUA S) 11 July 2002 (2002-07-11) figure 3 ----- -/--	1-90

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 2004

Date of mailing of the international search report

05/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mason, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/007176

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BARRY N P ET AL: "Applications of ultrafast lasers to two-photon fluorescence and lifetime imaging" PROCEEDINGS OF THE SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING SPIE-INT. SOC. OPT. ENG USA, vol. 4633, 23 January 2002 (2002-01-23), pages 50-61, XP001203516 ISSN: 0277-786X figures 1,2,5	1-90
A	US 4 245 800 A (HENDERSON DAVID M) 20 January 1981 (1981-01-20) figure 3	1-90
A	US 5 459 574 A (LEE JAMINE ET AL) 17 October 1995 (1995-10-17) figure 1	1-90
A	US 5 034 613 A (DENK WINFRIED ET AL) 23 July 1991 (1991-07-23) figure 1a	1-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/007176

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0071028	A	30-11-2000	AU 5283000 A EP 1187555 A1 JP 2003500094 T TW 487565 B WO 0071028 A1	12-12-2000 20-03-2002 07-01-2003 21-05-2002 30-11-2000
WO 02054071	A	11-07-2002	CA 2434076 A1 EP 1358482 A1 WO 02054071 A1 US 2002156872 A1 US 2002127563 A1	11-07-2002 05-11-2003 11-07-2002 24-10-2002 12-09-2002
US 4245800	A	20-01-1981	NONE	
US 5459574	A	17-10-1995	EP 0708322 A1	24-04-1996
US 5034613	A	23-07-1991	AT 170636 T AT 253727 T DE 69032621 D1 DE 69032621 T2 DE 69034117 D1 DE 69034117 T2 DK 807814 T3 EP 0500717 A1 EP 0807814 A1 ES 2123501 T3 ES 2210414 T3 HK 1010411 A1 JP 2848952 B2 JP 5503149 T WO 9107651 A1	15-09-1998 15-11-2003 08-10-1998 25-03-1999 11-12-2003 19-08-2004 15-03-2004 02-09-1992 19-11-1997 16-01-1999 01-07-2004 07-04-2000 20-01-1999 27-05-1993 30-05-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2004/007176

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, INSPEC, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/71028 A (PHOTOGEN INC) 30. November 2000 (2000-11-30) Seite 32 - Seite 34; Anspruch 14; Abbildung 12 Seite 41 - Seite 42	1-90
A	WO 02/054071 A (SALAFSKY JOSHUA S) 11. Juli 2002 (2002-07-11) Abbildung 3 ----- -/--	1-90

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *8* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Oktober 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mason, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2004/007176

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*

Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile

Betr. Anspruch Nr.

A

BARRY N P ET AL: "Applications of
ultrafast lasers to two-photon
fluorescence and lifetime imaging"
PROCEEDINGS OF THE SPIE - THE
INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL
ENGINEERING SPIE-INT. SOC. OPT. ENG USA,
Bd. 4633, 23. Januar 2002 (2002-01-23),
Seiten 50-61, XP001203516
ISSN: 0277-786X
Abbildungen 1,2,5

1-90

A

US 4 245 800 A (HENDERSON DAVID M)
20. Januar 1981 (1981-01-20)
Abbildung 3

1-90

A

US 5 459 574 A (LEE JAMINE ET AL)
17. Oktober 1995 (1995-10-17)
Abbildung 1

1-90

A

US 5 034 613 A (DENK WINFRIED ET AL)
23. Juli 1991 (1991-07-23)
Abbildung 1a

1-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2004/007176

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0071028	A	30-11-2000	AU 5283000 A 12-12-2000 EP 1187555 A1 20-03-2002 JP 2003500094 T 07-01-2003 TW 487565 B 21-05-2002 WO 0071028 A1 30-11-2000
WO 02054071	A	11-07-2002	CA 2434076 A1 11-07-2002 EP 1358482 A1 05-11-2003 WO 02054071 A1 11-07-2002 US 2002156872 A1 24-10-2002 US 2002127563 A1 12-09-2002
US 4245800	A	20-01-1981	KEINE
US 5459574	A	17-10-1995	EP 0708322 A1 24-04-1996
US 5034613	A	23-07-1991	AT 170636 T 15-09-1998 AT 253727 T 15-11-2003 DE 69032621 D1 08-10-1998 DE 69032621 T2 25-03-1999 DE 69034117 D1 11-12-2003 DE 69034117 T2 19-08-2004 DK 807814 T3 15-03-2004 EP 0500717 A1 02-09-1992 EP 0807814 A1 19-11-1997 ES 2123501 T3 16-01-1999 ES 2210414 T3 01-07-2004 HK 1010411 A1 07-04-2000 JP 2848952 B2 20-01-1999 JP 5503149 T 27-05-1993 WO 9107651 A1 30-05-1991

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.